

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Eliška Kettnerová

# STANOVENÍ POROTHRAMYCINU POMOCÍ ULTRA- -VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE

## DETERMINATION OF POROTHRAMYCIN BY ULTRA-HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Karel Nesměrák, PhD.

Konzultant diplomové práce: Mgr. Zdeněk Kameník, Ph.D.

Praha 2012

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a MŠMT 2B08064.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 13. 9. 2011

## Abstrakt

Porothramycin je antibiotikum anthramycinové skupiny a je produkován kmenem *Streptomyces albus*. Porothramycin vykazuje antibakteriální a především protinádorové účinky. Zároveň je však prokazatelně kardiotoxický, a proto zatím nenachází využití v klinické praxi. Některé geny účastníci se syntézy porothramycinu lze použít k přípravě nových netoxických derivátů antibiotik metodou kombinatoriální biosyntézy.

Za tímto účelem bylo nezbytné vyvinout novou rutinní chromatografickou metodu pro analýzu porothramycinu pomocí UHPLC-UV-MS techniky. Na základě diskového difuzního testu pomocí citlivého kmene *Kocuria rhizophila* bylo nejprve vybráno vhodné kultivační médium pro produkci porothramycinu. Z kultivačního média bylo následně izolováno 1,7 mg komerčně nedostupného standardu porothramycinu pro účely vývoje a validace metody stanovení této látky. Současně bylo zjištěno, že kromě porothramycinu jsou do média produkovány také dva analogy porothramycinu. Konečná metoda stanovení porothramycinu se skládala z extrakce na pevné fázi na kolonkách obsahujících styren-divinylbenzenový sorbent s navázanými vinylpyrrolidonovými skupinami. Extrakt byl poté dávkován na UHPLC Acquity BEH C18 kolonu a analyzován v gradientovém módu s mobilními fázemi acetonitril a 0,1% mravenčí kyselina. Porothramycin byl detekován UV detektorem diodového pole (335 nm) a pro ověření identifikace látky byl využit hmotnostně-spektrometrický detektor.

Metoda byla částečně validována s limitem stanovitelnosti  $0,391 \mu\text{g ml}^{-1}$  a bylo potvrzeno, že porothramycin je dostatečně stabilní pro provedení analýzy. Výsledná metoda byla aplikována na stanovení porothramycinu v kultivačních médiích.

**Klíčová slova:** antibiotika, porothramycin, SPE, UHPLC, MS

**Předmětová hesla:** izolace a stanovení porothramycinu

## Abstract

Porothramycin is the antibiotic of anthramycin group and is produced by *Streptomyces albus*. Porothramycin is characterized by antibacterial and especially antitumor activity. But it has also been proved to be cardiotoxic; and therefore, it has not been applied in clinical practice yet. However, some genes involved in the synthesis of porothramycin can be used for the preparation of new nontoxic derivatives of antibiotics by means of combinatorial biosynthesis.

For this purpose, it was necessary to develop a new routine chromatographic UHPLC-UV-MS method for analysis of porothramycin. A suitable cultivation broth for production of porothramycin was found using disk diffusion test with the sensitive strain *Kocuria rhizophila*. Then, 1.7 mg of porothramycin standard, which was not available on the market, was isolated from the cultivation broth and used for the development and validation of the method. Also, it was found out that apart from porothramycin, two porothramycin-related compounds were produced into the cultivation broth. In the final method for determination of porothramycin, the solid phase extraction using styren-divinylbenzene sorbent with vinylpyrrolidone functionalities was applied. The extracts were then loaded onto the UHPLC Acquity BEH C18 column and analyzed under gradient mode with mobile phases of acetonitrile and 0.1% formic acid. The column effluent was monitored by UV diode array detector (335 nm) and the porothramycin identification was confirmed by mass spectrometry.

The method was partially validated with the limit of quantification of 0,391  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and it was proved that the stability of porothramycin is sufficient for performing its analysis. The final method was applied for determination of porothramycin in cultivation broths.

**Key words:** antibiotics, porothramycin, SPE, UHPLC, MS

**Subject heading:** isolation and determination of porothramycin

## Poděkování

Tato diplomová práce byla vypracována v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky, v Laboratoři genetiky, fyziologie a bioinženýrství hub a Laboratoři biologie sekundárního metabolismu.

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli Zdeňku Kameníkovi, PhD. a školiteli-garantovi RNDr. Karlu Nesměrákovi, PhD. za cenné rady, připomínky a metodické vedení práce. Dále bych chtěla poděkovat za pomoc, podporu a příjemné pracovní prostředí všem kolegům z laboratoře. V neposlední řadě děkuji mým nejbližším, kteří mě také po celou dobu studia podporovali.

# OBSAH

|   |           |
|---|-----------|
| SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....                                    | 8         |
| <b>1 ÚVOD .....</b>   | <b>9</b>  |
| 1.1 POROTHRAMYCIN, ANTIBIOTIKUM BENZODIAZEPINOVÉ SKUPINY .....              | 9         |
| <b>2 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>  | <b>11</b> |
| 2.1 PRODUKCE POROTHRAMYCINU A JEHO BIOLOGICKÁ AKTIVITA .....                | 11        |
| 2.2 CHEMICKÁ STRUKTURA A FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI POROTHRAMYCINU ..... | 13        |
| 2.3 POUŽITÁ METODIKA .....  | 15        |
| 2.3.1 Testování biologické aktivity .....                                   | 15        |
| 2.3.2 Extrakce kapaliny kapalinou .....                                     | 16        |
| 2.3.3 Extrakce na pevné fázi.....   | 16        |
| 2.3.4 Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....                    | 17        |
| 2.3.5 Hmotnostní spektrometrie .....  | 19        |
| <b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>  | <b>21</b> |
| 3.1 CHEMIKÁLIE.....   | 21        |
| 3.2 SLOŽENÍ KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ A PŮD.....                                   | 21        |
| 3.3 INSTRUMENTACE .....   | 22        |
| 3.4 PŘÍPRAVA STANDARDU POROTHRAMYCINU .....                                 | 22        |
| 3.4.1 Kultivace <i>Streptomyces albus</i> .....                             | 22        |
| 3.4.2 Extrakce kapaliny kapalinou .....                                     | 22        |
| 3.4.3 Preparativní HPLC .....   | 23        |
| 3.5 STANOVENÍ POROTHRAMYCINU .....  | 23        |
| 3.5.1 Extrakce na pevné fázi.....   | 23        |
| 3.5.2 Analýza pomocí UHPLC.....   | 23        |
| 3.5.3 Testované chromatografické kolony .....                               | 24        |
| 3.6 STANOVENÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY POROTHRAMYCINU .....                      | 24        |
| <b>4 VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>   | <b>26</b> |
| 4.1 VÝBĚR VHODNÉHO KULTIVAČNÍHO MÉDIA A BIOASSAY .....                      | 26        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 4.2      | IDENTIFIKACE POROTHRAMYCINU V KULTIVAČNÍM MÉDIU .....     | 27        |
| 4.3      | OPTIMALIZACE EXTRAČNÍCH METOD.....                        | 31        |
| 4.3.1    | Vývoj rutinní extrakční metody.....                       | 31        |
| 4.3.1.1  | Eluční profil.....  | 33        |
| 4.3.1.2  | Výtěžnost SPE metody .....                                | 33        |
| 4.3.2    | Vývoj extrakce pro přípravu standardu porothramycinu..... | 34        |
| 4.4      | OPTIMALIZACE INSTRUMENTÁLNÍCH METOD .....                 | 37        |
| 4.4.1    | Vývoj preparativní HPLC.....                              | 37        |
| 4.4.2    | Vývoj UHPLC metody .....                                  | 41        |
| 4.4.2.1  | Testování UHPLC kolon .....                               | 41        |
| 4.4.2.2  | Testování mobilních fází .....                            | 42        |
| 4.4.2.3  | Testování teploty kolony BEH C18 .....                    | 44        |
| 4.4.2.4  | Testování elučního programu .....                         | 44        |
| 4.5      | ČÁSTEČNÁ VALIDACE UHPLC METODY.....                       | 48        |
| 4.5.1    | Kalibrační závislost .....                                | 49        |
| 4.5.2    | Mez stanovitelnosti (LOQ).....                            | 49        |
| 4.5.3    | Přesnost měření .....                                     | 49        |
| 4.5.4    | Správnost metody .....                                    | 50        |
| 4.5.5    | Stabilita.....  | 51        |
| 4.6      | APLIKACE VYVINUTÉ UHPLC METODY .....                      | 51        |
| <b>5</b> | <b>ZÁVĚR.....</b>   | <b>53</b> |
| <b>6</b> | <b>LITERATURA .....</b>                                   | <b>54</b> |

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

|            |  |
|------------|--|
| A          | Absorbance   |
| BEH        | Bridged Elhyl Hybrid (sor bent pro UHPLC, Waters)  |
| DAD        | detektor diodového pole (photo diode array detector)   |
| DNA        | kyselina deoxyribonukleová   |
| G+         | grampozitivní bakterie   |
| G–         | gramnegativní bakterie   |
| H          | výškový ekvivalent teoretického patra ( $\mu\text{m}$ )  |
| HLB        | Hydrophilic-Lipophilic-Balanced (sor bent pro extrakci<br>tuhou fází, Waters)                    |
| HPLC       | vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high<br>performance liquid chromatography)               |
| $m/z$      | poměr hmotnost ku náboji   |
| $M_r$      | relativní molekulová hmotnost  |
| p          | tlak (psi; MPa)  |
| PBD        | pyrrolo-1,4-benzodiazepinová antibiotika   |
| RPM        | počet otáček za minutu   |
| SPE        | extrakce na tuhé fázi (solid phase extraction)   |
| t          | čas (min)  |
| TOF        | analyzátor oddělující ionty na základě doby jejich letu<br>(time-of-flight)                      |
| u          | lineární rychlost ( $\text{mm s}^{-1}$ )   |
| UHPLC      | ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (ultra-high-<br>-performance liquid chromatography) |
| UV detekce | detekce s využitím ultrafialového záření (ultraviolet)   |



# 1 ÚVOD

## 1.1 Porothramycin, antibiotikum benzodiazepinové skupiny

Éra antibiotik byla zahájena objevem penicilinu v roce 1928 Alexandrem Flemigem. Další zásadní objevy v této oblasti byly učiněny ve 40. a 50. letech 20. století a nejvíce antibiotik bylo objeveno přibližně mezi lety 1940–1960.<sup>1</sup> Antibiotika v současné době představují nejúčinnější prostředek pro léčbu infekčních onemocnění způsobených patogenními bakteriemi nebo houbami. V poslední době však v souvislosti s antibiotiky vyvstaly dva zásadní problémy. Prvním z nich je stále rostoucí sekundární rezistence<sup>2</sup> patogenních bakterií vůči antibiotikům, která souvisí především s jejich nesprávným používáním.<sup>3</sup> Druhým problémem je skutečnost, že v poslední době dochází k výraznému zpomalení objevu nových antibiotik. To se projevuje například tím, že jsou často nalézány již známé látky.<sup>4</sup> Vzhledem k těmto závažným skutečnostem se vědci snaží vyhledávat a připravovat nová antibiotika. Jednou z možností, jak získat nová antibiotika pro klinickou praxi, je výzkum již objevených látek, které prozatím své uplatnění nenašly. V současnosti jsou totiž popsány tisíce biologicky aktivních přírodních látek, ale v praxi je využíváno jen malé procento z nich.

Jednou z látek, která by mohla být přínosem ve vědě a medicíně je porothramycin, antibiotikum produkované bakterií *Streptomyces albus*. Tato látka patří do skupiny pyrrolo-1,4-benzodiazepinových antibiotik (PBD), což je třída přírodních produktů produkovaných aktinomycetami, ale i synteticky připravených látek, s antibakteriálními a především protinádorovými účinky. Mechanismus účinku porothramycinu spočívá v sekvenčně selektivní vazbě antibiotika na deoxyribonukleovou kyselinu (DNA).<sup>5</sup> Zároveň však klinické testy na myších prokázaly značnou kardiotoxicitu této látky, která znemožňuje její využití v medicíně.<sup>6</sup>

Porothramycin by například mohl být použit pro přípravu hybridních antibiotik pomocí metody kombinatoriální biosyntézy. Tato metoda je založena na vytvoření mutantního producenta, v němž se zkombinují biosyntetické geny z alespoň dvou různých producentů antibiotik. V laboratoři biologie sekundárního metabolismu se pokoušíme připravit hybridní antibiotikum, které by vzniklo jako důsledek kombinace

biosyntetických genů pro produkci porothramycinu a linkomycinu. Jednou z nezbytných podmínek pro takový postup je znalost biosyntetické dráhy porothramycinu, která dosud nebyla plně objasněna. Pro studium biosyntetické dráhy a funkcí jednotlivých biosyntetických genů porothramycinu je potřeba vyvinout metodu stanovení tohoto analytu v kultivačním médiu.

Cíle této diplomové práce jsou shrnuty v následujících bodech.

- Připravit komerčně nedostupný standard porothramycinu izolací z kultivačního média.
- Vyvinout rutinní metodu extrakce porothramycinu z kultivačního média a následnou metodu stanovení této látky pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) s využitím detekce pomocí UV detektoru s diodovým polem (DAD) a případně hmotnostně-spektrometrického detektoru (MS).
- Metodu stanovení porothramycinu částečně validovat a aplikovat na reálné vzorky.

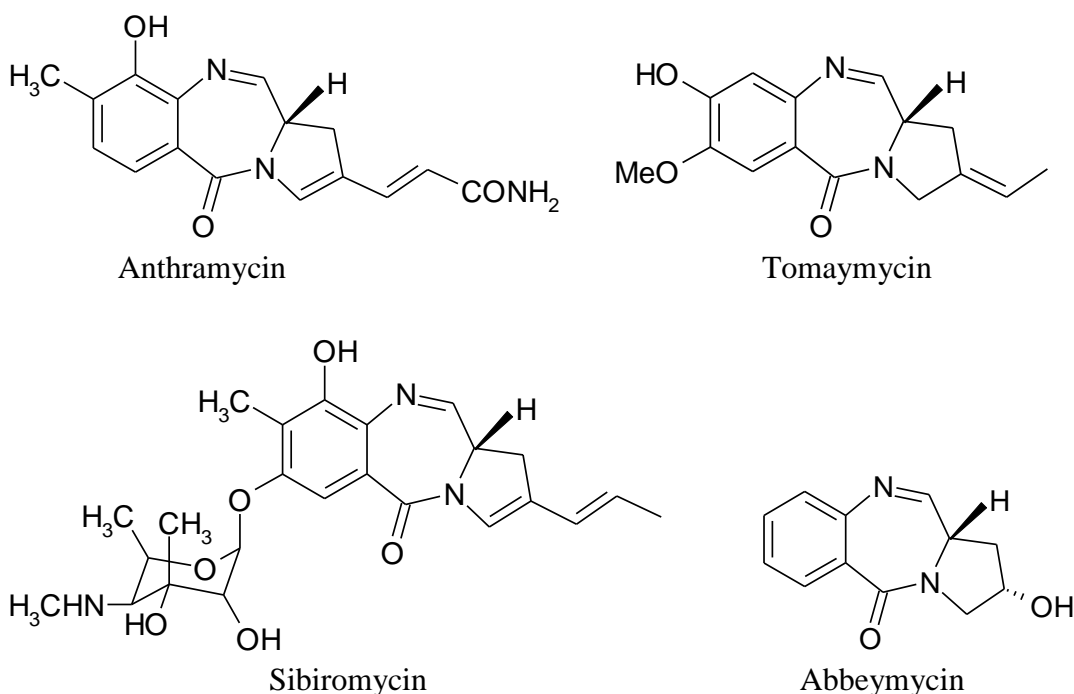
## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Produkce porothramycinu a jeho biologická aktivita

Do PBD skupiny antibiotik, neboli do skupiny anthramycinové, patří kromě porothramycinu další významné a strukturně podobné látky, které jsou produkovány různými aktinomycetami (Tab. 1). Struktury vybraných bioaktivních PBD jsou znázorněny na Obr. 1.

Tab. 1 Pyrrolo-1,4-benzodiazepiny a jejich hlavní producenti<sup>7</sup>

| Antibiotikum PBDs           | Producent                          |
|-----------------------------|------------------------------------|
| anthramycin <sup>8</sup>    | <i>Streptomyces refuineus</i>      |
| tomaymycin <sup>9</sup>     | <i>Streptomyces achromogenes</i>   |
| oxotomaymycin <sup>10</sup> | <i>Streptomyces achromogenes</i>   |
| sibiromycin <sup>11</sup>   | <i>Streptosporangium sibiricum</i> |
| sibanomicin <sup>12</sup>   | <i>Micromonospora</i> sp. SF2364   |
| chicamycin <sup>13</sup>    | <i>Streptomyces</i> sp. J576-99    |
| mazethramycin <sup>14</sup> | <i>Streptomyces thioluteus</i>     |
| prothracarcin <sup>15</sup> | <i>Streptomyces umbrosus</i>       |
| abbeymycin <sup>16</sup>    | <i>Streptomyces</i> sp. AB-99F-52  |
| porothramycin <sup>6</sup>  | <i>Streptomyces albus</i>          |
| DC-81 <sup>17</sup>         | <i>Streptomyces</i> sp.            |
| RK-1441 <sup>18</sup>       | <i>Streptomyces</i> sp. RK-1441    |
| neothramycin <sup>19</sup>  | <i>Streptomyces</i> sp. MC916-C4   |
| limazepine <sup>20</sup>    | <i>Micrococcus</i> sp. ICBB8177    |



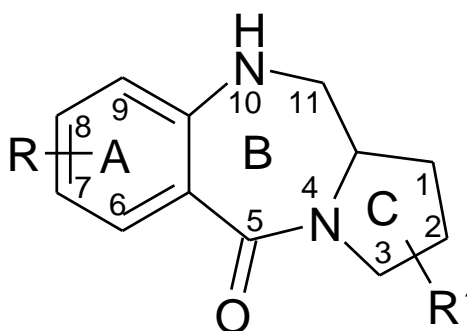
Obr. 1 Některé bioaktivní pyrrolobenzodiazepiny

Z biologického hlediska vykazují PBD antibiotické a protinádorové účinky. Porothramycin má antibiotickou aktivitu proti Gram-pozitivním (G+) bakteriím<sup>21</sup> a anaerobům, ale je neaktivní proti Gram-negativním (G-) bakteriím a plísním. Mezi kmeny, proti kterým vykazuje porothramycin biologickou aktivitu, patří např. *Bacillus subtilis* a *Bacteroides fragilis*.<sup>6</sup> Silná protinádorová aktivita porothramycinu se projevila při klinických testech na pokusných zvířatech (myších) proti P388 a L1210 leukémii a proti B16 melanomu.<sup>6</sup> Jak již bylo zmíněno v úvodu, porothramycin je kardiotoxický, proto není zatím klinicky využíván.

Mechanismus antibiotického působení PBD je založen na tvorbě kovalentní vazby s guaninem v DNA, což inhibuje syntézu DNA. Pro vznik této vazby je důležité asymetrické centrum na uhlíku C<sub>11</sub>, což předurčuje sloučenině pravotočivé vinutí, které usnadňuje vazbu v malém žlábků DNA. Díky tvorbě kovalentní vazby s DNA jsou pyrrolo-1,4-benzodiazepiny označovány jako látky s potenciálními protinádorovými účinky, přičemž mají minimální vliv na kostní dřeň.<sup>22</sup>

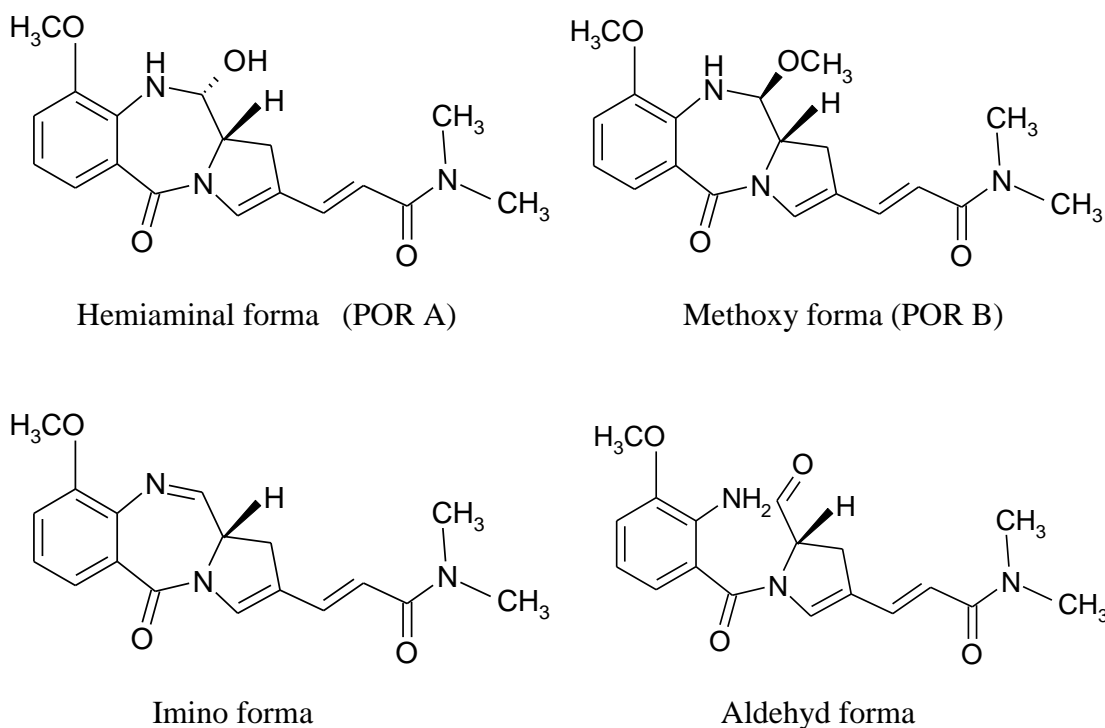
## 2.2 Chemická struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti porothramycinu

Základní struktura pyrrolo-1,4-benzodiazepinů (Obr. 2) je založena na tricyklickém systému, který se skládá z aromatického kruhu (A), struktury 1,4-diazepin-5-on tvořící kruh prostřední (B) a kruhu pyrrolového s různým stupněm nasycenosti (C). Různé stupně a typy substituentů na A- a C-kruhu způsobují chemickou rozmanitost všech PBD.<sup>7</sup>



Obr. 2 Základní struktura pyrrolo-1,4-benzodiazepinů

Literatura uvádí, že se PBD vyskytují v různých formách. Gerratana<sup>7</sup> uvádí tři různé formy PBD (imino, hemiaminal a methoxy), a to v závislosti na použitém rozpouštědle a na podmínkách analýzy a skladování. Ve vodném roztoku je imino forma v rovnováze s formou hemiaminalu. V protických rozpouštědlech (alkoholy) je v rovnováze s imino formou kromě hemiaminalu také methoxy forma. PBD jsou nejstabilnější právě v této methoxy formě a jako takové bývají obvykle skladovány rozpuštěné v methanolu a zmrazené při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Kromě výše zmíněných uzavřených forem byla u PBD látek pozorována také otevřená forma aldehydu.<sup>23</sup> Z uvedených informací vyplývá, že se porothramycin může vyskytovat ve čtyřech různých formách, které jsou znázorněny na Obr. 3. V Tab. 2 jsou pak uvedeny průměrné molekulární hmotnosti  $M_r$  jednotlivých forem. Ve starší literatuře se setkáváme s označením porothramycin A (POR A), která odpovídá formě hemiaminalu a porothramycin B (POR B) odpovídající methoxy formě.<sup>6</sup>



Obr. 3 Formy porothramycinu

Tab. 2 Přehled čtyř forem porothramycinu

| forma porothramycinu | molekulární vzorec   | $M_r$   | $[M+H]^+$ v pozitivním módu |
|----------------------|----------------------|---------|-----------------------------|
| Hemiaminal (POR A)   | $C_{18}H_{21}N_3O_4$ | 343,382 | 344,1610                    |
| Methoxy (POR B)      | $C_{19}H_{23}N_3O_4$ | 357,409 | 358,1768                    |
| Imino                | $C_{18}H_{19}N_3O_3$ | 325,362 | 326,1508                    |
| Aldehyd              | $C_{18}H_{21}N_3O_4$ | 343,382 | 344,1610                    |

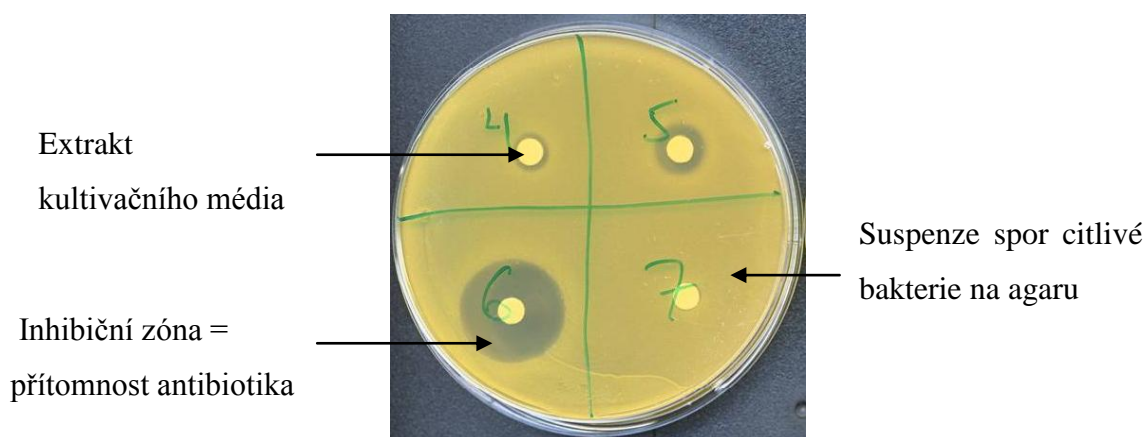
Porothramycin ve formě hemiaminalu je bledě žlutý prášek, methoxy forma se získává jako žluté jehličky a oba typy jsou snadno rozpustné v methanolu, chloroformu a pyridinu. Mírně rozpustné jsou v ethylacetátu a ethyleteru, ale prakticky se nerozpouští v *n*-hexanu a ve vodě. UV spektra všech forem porothramycinu jsou podobná, charakteristická maxima jsou při 214, 235 a 335 nm v methanolu a v kyselém ani zásaditém roztoku nedochází k jejich posunu.<sup>6</sup>

## 2.3 Použitá metodika

### 2.3.1 Testování biologické aktivity

Ke stanovení účinnosti antibiotik proti patogenním mikrobům je používán buď tzv. E-test nebo zředňovací zkumavkový test anebo diskový difúzní test (Kirby-Bauer test), kdy se vrstva citlivého organismu, nejčastěji G+ nebo G- bakterie rozprostře na Petriho misky s agarovou půdou. Na tuto vrstvu se umístí disky z filtračního papíru nasycené testovaným vzorkem. Jestliže vzorek obsahuje antibiotikum, na které není citlivý kmen rezistentní, vytvoří se během kultivace okolo disku inhibiční zóna. Průměr této zóny závisí na citlivosti bakterie na antibiotikum a na jeho koncentraci. Na Obr. 4 je znázorněno provedení diskového difúzního testu. V horní a dolní levé části obrázku lze pozorovat vytvořené zóny, které mají různý průměr. V pravé dolní části se zóna nevytvořila.

Další možností testování biologické aktivity je test, při kterém se do agarové půdy, na které se opět rozprostře suspenze spor citlivé bakterie, vytvoří kruhové otvory o definované velikosti. Do otvoru se následně nanese kultivační médium, které testujeme na přítomnost antibiotik. Vytvoření zóny kolem otvoru opět potvrzuje přítomnost antibiotika, na něž není daná citlivá bakterie rezistentní.



Obr. 4 Diskový difúzní test (ilustrační obrázek, testováno v rámci experimentu v laboratoři biologie sekundárního metabolismu)

### 2.3.2 Extrakce kapaliny kapalinou

Princip metody extrakce kapaliny kapalinou (LLE; z angl. "liquid-liquid extraction") je založen na distribuci analytů a interferentů mezi dvě navzájem nemísitelné kapaliny. Ve většině případů se jedná o vodný vzorek a organické rozpouštědlo nemísitelné s vodou. Rozdělení analytů mezi tyto fáze probíhá na základě různé rozpustnosti (rozdílných rozdělovacích koeficientů) v použitých rozpouštědlech. Čím větší je rozdíl mezi rozdělovacími koeficienty látek, tím dokonalejší je jejich oddělení.

Tato metoda se vyznačuje jednoduchostí a možností extrakce širokého spektra látek volbou různých rozpouštědel. Nevýhodou je však toxicita většiny rozpouštědel a nutnost zbavení se jejich nadbytku.

### 2.3.3 Extrakce na pevné fázi

Extrakce na pevné fázi (SPE; z angl. "solid phase extraction") je metoda přípravy vzorků, kdy se analyt sorbuje na tuhou fázi z fáze kapalné. Interakce analytu s tuhou fází musí být silnější než s fází kapalinou, ve které je analyt rozpuštěn.<sup>24,25</sup> Použitím SPE se lze vyhnout např. emulgování směsi a špatnému rozdělení fází. Největšími výhodami SPE oproti LLE jsou však větší výtěžnost, lepší reprodukovatelnost a také snížení spotřeby organických rozpouštědel. SPE se nejčastěji používá při zpracování vzorků ve vodné fázi, především pro extrakci netěkavých a středně těkavých látek. Současně přitom dojde k jejich zakonzentrování a odstranění nežádoucích látek, které ruší následná analytická měření.<sup>26</sup>

Jedním z nejdůležitějších kroků je volba správného sorbentu. Mechanismus retence v SPE je obdobný jako v kapalinové chromatografii, a proto i používané sorbenty jsou podobné.<sup>27</sup> Používají se chemicky vázané obrácené fáze na bázi silikagelu (silikagel s chemicky vázanými nepolárními modifikátory, například C18, C8, C4, Phenyl, CN), a to pro izolaci nepolárních až mírně polárních látek z polárních matric. Dále se používají normální fáze pro izolaci polárních látek z nepolárních matric (silikagel, oxid hlinitý, Florisil, silikagel s chemicky vázanými polárními modifikátory např.: CN, diol, NH<sub>2</sub>) a iontově výměnné fáze (ANEX – silikagel s chemicky vázaným kladně nabitým modifikátorem: kvarterní amoniové báze, sekundární aminy; KATEX – silikagel s chemicky vázaným záporně nabitým modifikátorem: benzen- či propylsulfonová

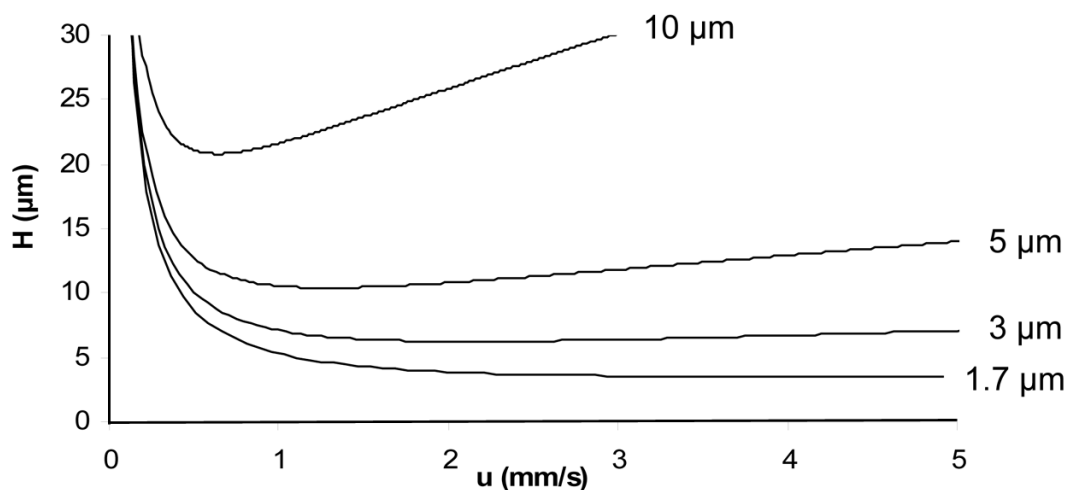


kyselina). V současnosti se rozvíjejí i sorbenty obsahující funkční skupiny pro více různých interakcí. Příkladem může být sorbent HLB (z angl. "hydrophilic-lipophilic-balanced"), který obsahuje hydrofilní skupinu (polární interakce), ale i monomer lipofilní (retence na reverzní fázi). Díky těmto dvěma interakcím je HLB sorbent univerzálnější než například silikagelový sorbent s C18 ligandem.<sup>28</sup> Na trhu jsou dostupné i sorbenty založené na již zmiňovaných interakcích v kombinaci s iontovou výměnnou. Mezi tyto sorbenty patří např. Oasis MCX obsahující sulfonovou skupinu pro extrakci bazických látek a Oasis MAX obsahující kvartérní amin pro extrakci kyselých látek.<sup>28,29</sup>

Největšími výhodami sorbentů HLB, MCX a MAX, které nejsou založeny na silikagelu, jsou vysoká pH stabilita, velmi dobrá retence polárních i nepolárních látek a minimální vliv vysušení sorbentu na reprodukovatelnost.

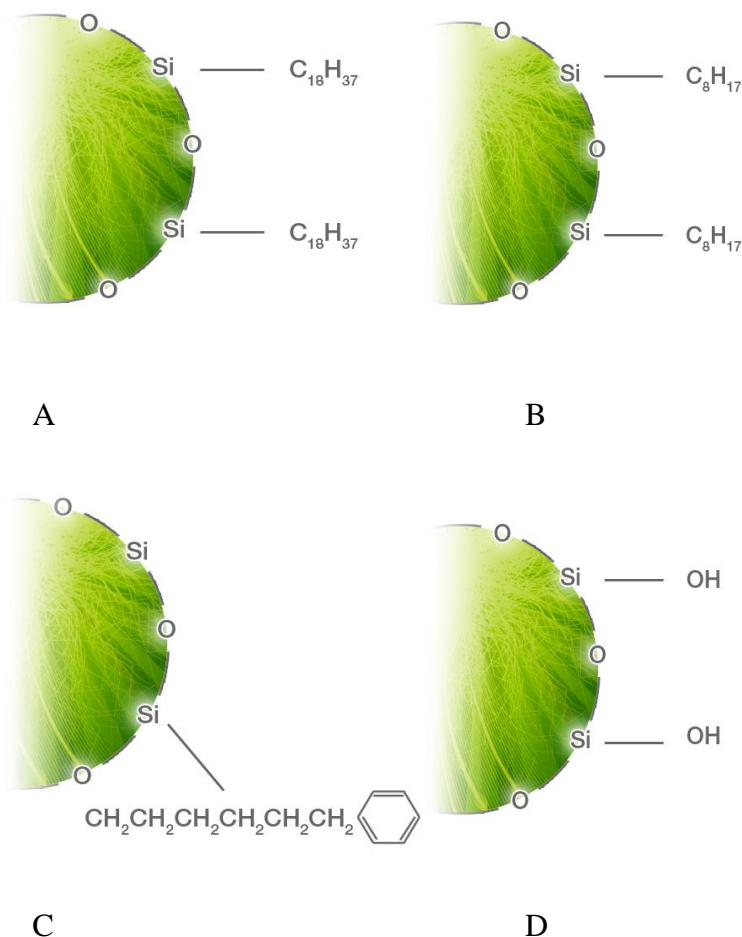
#### **2.3.4 Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie**

Po čistícím a prekoncentračním kroku pomocí SPE představuje biologický vzorek stále složitou směs mnoha látek, proto je nutné k chemické analýze využít některou separační metodu. Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC; z angl. "Ultra-High-Performance Liquid Chromatography") je poměrně nová separační technika založená na principech vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC; z angl. "High-Performance Liquid Chromatography"), ale využívající menší částice sorbentu. Velikost částic v UHPLC kolonách je 1,7  $\mu\text{m}$ . Z Van Deemterovy křivky (Obr. 5) vyplývá, že při použití takto malých částic sorbentu lze pracovat v daleko větším rozsahu lineárních rychlostí (na rozdíl od standardních částic o průměru 3 nebo 5  $\mu\text{m}$ ) za několikanásobně vyšší účinnosti (menší výškový ekvivalent teoretického patra). Dále použití těchto částic způsobuje podstatné zvýšení zpětného tlaku (až 15000 psi), čemuž je přizpůsobena nová instrumentace. V porovnání s klasickou HPLC je UHPLC citlivější metodou, čímž došlo ke snížení mezí detekce. Další výhodou UHPLC je podstatné zkrácení doby analýzy, což vede ke snížení nákladů (menší spotřeba rozpouštědel).<sup>30</sup>



Obr. 5 Van Deemterovy křivky při použití různých velikostí částic – závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární rychlosti (převzato z <sup>31</sup>)

Separční proces klasických UHPLC kolon využívá sorbentů připravených technologií BEH (z angl. "Ethylene bridged hybrid"), které vykazují vysokou mechanickou a chemickou odolnost a velmi dobrou separační účinnost. Tato vlastnost je způsobena propojením volných hydroxylových skupin silikagelu ethylenovými můstky. Tyto sorbenty pak odolávají velkému rozmezí pH a většinu kolon lze použít v oblasti pH 2 až 12. Na Obr. 6 jsou znázorněné některé stacionární fáze pro UHPLC kolony s různým navázaným ligandem, které jsou v současné době k dispozici, a to C18 a C8, Shield RP18 (C18 se zabudovanou polární karbamátovou skupinou), Phenyl, Pentafluorophenyl,  $\text{NH}_2$ , CN, SCX (z angl. "strong cation exchange"), Silica a další. Každá stacionární fáze poskytuje rozdílné kombinace hydrofobicity, silanolové aktivity, hydrolytické stability a chemické interakce s analytem.



Obr. 6 Příklad UHPLC kolon, A) C18, B) C8, C) Phenyl, D) Silica (převzato z <sup>32</sup>)

Pro UHPLC jsou komerčně dostupné běžné detektory, jako je UV detektor, DAD detektor, fluorescenční detektor a několik druhů hmotnostních spektrometrů.

### 2.3.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS, z angl. "mass spectrometry") je fyzikálně-chemická metoda, která určuje hmotnosti atomů, molekul a molekulových fragmentů po jejich převedení na ionty. Nabitě částice separuje hmotnostní spektrometr podle jejich efektivní hmotnosti  $m/z$ . Výsledkem analýzy je hmotnostní spektrum, kde představuje vodorovná osa hodnotu  $m/z$  a na svislé ose je vynesena odezva detektoru.

Velice důležitými částmi hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj

a hmotnostní analyzátor. Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul analyzované látky na nabitě částice. Lze využít tvrdou ionizaci (např. elektronová ionizace), při které dojde k rozsáhlé fragmentaci molekuly nebo měkkou ionizaci, která je ve spojení s kapalinovou chromatografií využívanější. Měkká ionizace se provádí např. elektrosprejem (ESI; z angl. "electrospray ionization"). Při ionizaci elektrosprejem prochází eluát po výstupu z chromatografické kolony kapilárou, na které je vloženo vysoké napětí (3-5 kV). Vznikající kapičky po rozprášení na výstupu z kapiláry za pomoci zmlžujícího plynu nesou na povrchu velké množství nábojů. Dalším odpařováním rozpouštědla dojde k zvýšení hustoty povrchového náboje. Při dosažení kritické hodnoty dochází k tzv. Coulombické explozi, tj. rozpadu na ještě menší kapičky s rozdělením původních nábojů, opakování tohoto procesu vede až k uvolnění  $[M+H]^+$  iontů.<sup>33</sup>

Vzniklou směs iontů pak rozděluje na základě různých  $m/z$  hmotnostní analyzátor. Mezi používané hmotnostní analyzátory patří např. kvadrupólový, magnetický, iontová past a průletový analyzátor neboli analyzátor doby letu (TOF; z angl. "Time of Flight"). Principem TOF analyzátoru je skutečnost, že se ionty s menší hodnotou  $m/z$  o stejné kinetické energii pohybují rychleji než ionty s vyšší hodnotou  $m/z$ . Tím se docílí separace iontů o různé  $m/z$  a hmotnostní spektrum se získá měřením doby letu iontů průletovou trubicí mezi zdrojem a detektorem.<sup>34</sup>

Hmotnostní spektrometrie se využívá především pro určení nebo potvrzení struktury chemických látek. Ve spojení s chromatografickými metodami lze hmotnostní spektrometr využít jako detektor a to především ke stopové analýze organických látek.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Chemikálie

**Acetonitril**, LC/MS grade (99,95 %, Biosolve, Nizozemí).

**Agar** (OXOID, Anglie).

**Amberlit® XAD-4** (Supelco, USA).

**Dichlormethan** (99,90 %, Chromservis, ČR).

**Glukóza** (Lach-Ner, Česká republika).

**Hexan** (99,00 %, Merck, Německo).

**Hovězí extrakt** (OXOID, Anglie).

**Kvasniční extrakt** (OXOID, Anglie).

**Chlorid sodný** (Sigma-Aldrich, Německo).

**Leucine Enkephalin acetate hydrate** (2 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo).

**Methanol**, LC/MS grade (99,95 %, Biosolve, Nizozemí).

**Mravenčí kyselina** (98,00 %, Lach-Ner, ČR).

**Octová kyselina** (99 %, Sigma-Aldrich, Německo).

**Pepton** (Chemos, Česká republika).

**Sladový extrakt** (OXOID, Anglie).

**Trifluorooctová kyselina** (99,95 % ULC/MS grade, Biosolve, Nizozemí).

**Voda**, HPLC grade, příprava reverzní osmózou na Direct-Q 3 UV (Millipore, USA).

### 3.2 Složení kultivačních médií a půd

- BG médium – kvasniční extrakt 4 g  $\text{l}^{-1}$ , sladový extrakt 10 g  $\text{l}^{-1}$ ,  $\text{CaCO}_3$  2 g  $\text{l}^{-1}$ , pH = 7,2; po sterilizaci přidána glukóza 4 g  $\text{l}^{-1}$  a kultivace 24 h při 28 °C
- ISP I médium – kvasniční extrakt 4 g  $\text{l}^{-1}$ , sladový extrakt 10 g  $\text{l}^{-1}$ , pH = 7,2; po sterilizaci přidána glukóza 4 g  $\text{l}^{-1}$  a kultivace 24 h při 28 °C
- YEME, AVM médium – viz 3.4.1
- B1 agarová půda – hovězí extrakt 10 g  $\text{l}^{-1}$ , pepton 10 g  $\text{l}^{-1}$ , NaCl 5 g  $\text{l}^{-1}$ , agar 20 g  $\text{l}^{-1}$ , destilovaná voda, pH = 7,2

### 3.3 Instrumentace

UHPLC analýzy byly provedeny na ultra-vysokoučinném kapalinovém chromatografu Acquity UPLC<sup>®</sup> vybaveným PDA 2996 detekčním systémem (DAD detektor) s rozmezím vlnových délek 194–800 nm a LCT Premier XE hmotnostním spektrometrem s ESI ionizací a TOF analyzátozem (Waters, USA). Data byla vyhodnocena programem MassLynx 4.0 software (Waters, USA).

HPLC analýzy byly provedeny na vysokoučinném kapalinovém chromatografu (Waters, USA) vybaveném UV detektorem 486 (Waters, USA). Data byla vyhodnocena programem Empower software (Waters, USA).

### 3.4 Příprava standardu porothramycinu

#### 3.4.1 Kultivace *Streptomyces albus*

Spory *Streptomyces albus* subsp. *albus* ATCC39897 (sbírka Mikrobiologického ústavu AV ČR) byly naočkovány do 50 ml kultivačního YEME média (kvasniční extrakt 3 g l<sup>-1</sup>, pepton 5 g l<sup>-1</sup>, sladový extrakt 3 g l<sup>-1</sup>, pH 7,2; po sterilizaci přidán 1 ml 50% glukózy a 100 µl 2,5 mol l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> a kultivovány 24 h při 28 °C (očkovací kultura I. generace). Médium AVM (50 ml), které obsahovalo kvasniční extrakt 2 g l<sup>-1</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g l<sup>-1</sup>, CaCO<sub>3</sub> 5 g l<sup>-1</sup>, NaCl 2 g l<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g l<sup>-1</sup>, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,05 g l<sup>-1</sup>, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,05 g l<sup>-1</sup>, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,05 g l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,1 g l<sup>-1</sup>, glukóza 5 g l<sup>-1</sup>, bylo naočkováno 5 % očkovací kultury a bylo kultivováno na rotační třepačce 240 h při 28 °C (II. generace). Kultura byla následně centrifugována (3000 rpm, 4 °C, 13 min) a získaný supernatant byl použit pro další experimenty.

#### 3.4.2 Extrakce kapaliny kapalinou

Metodou LLE byl získaný supernatant nejprve extrahován hexanem (poměr objemů 1:1). Následně byla použita tmavá vodná část pro vytřepání do dichlormethanu (poměr objemů 1:1). Pro další experimenty byla použita organická část. Mezi uvedenými kroky byl supernatant centrifugován (3000 rpm, 4 °C, 13 min). Jednotlivé extrakty

dichlormethanu byly poté spojeny a odpařeny na vakuové rotační odparce Rotavapor<sup>®</sup> R-215 (BUCHI, Švýcarsko).

### **3.4.3 Preparativní HPLC**

Získaný extrakt porothramycinu byl dále dočištěn pomocí preparativní HPLC. Byla použita preparativní kolona Luna C18 (Luna C18, 250 mm × 15 mm, 5 μm; Phenomenex, USA). Eluce byla provedena v izokratickém módu s použitím následující mobilní fáze: 1mM mravenčan amonný o pH = 4,00 (A) - 100% acetonitril (B) v poměru A:B 70:30 (v/v). Jako optimální průtoková rychlost byla zvolena 4 ml min<sup>-1</sup> a UV detekce při 230 nm a 335 nm. Celkový čas analýzy činil 20 min. Jednotlivé frakce byly odpařeny dosucha a následným rozpuštěním v methanolu byly vzorky spojeny. Identifikace izolovaného standardu porothramycinu byla ověřena metodou UHPLC s UV a MS detekcí.

## **3.5 Stanovení porothramycinu**

### **3.5.1 Extrakce na pevné fázi**

Uvedená SPE metoda byla vyvinuta v této diplomové práci pro rutinní stanovení porothramycinu. Supernatant kultivačního média byl přečištěn a prekoncentrován pomocí kolonek OASIS HLB 60 mg (HLB, Waters, USA). Kolonka byla nejprve kondicionována 3 ml methanolu a následně ekvilibrována 3 ml vody. Poté byly nanесeny 2 ml vzorku a následně byla kolonka promyta 3 ml vody. Nakonec byl porothramycin eluován 1 ml methanolu. Získaný eluát byl odpařen a pro další kroky stanovení byl rozpuštěn opět v methanolu, a to v takovém množství, aby byl 10× prekoncentrován.

### **3.5.2 Analýza pomocí UHPLC**

Získané extrakty kultivačního média byly analyzovány pomocí UHPLC spojené s UV (DAD) a MS (ToF) detekcí (Waters, USA). Vzorky byly dávkovány na kolonu

Acquity BEH C18 (BEH C18, 50 mm × 2,1 mm, 1,7 µm; Waters, USA). Teplota kolony byla udržována při 40 °C. Jako optimální mobilní fáze byly použity 0,1% mravenčí kyselina (A) a 100% acetonitril (B) s průtokovou rychlostí 0,4 ml min<sup>-1</sup> a s lineární gradientovou elucí (min/% B): 0/5; 1/5; 6/31,5; výplach kolony (1,5 min, 100% B); ekvilibrace kolony (1,5 min, 5% B). Pro UV detekci bylo použito rozmezí vlnových délek 200–600 nm. Vzhledem k tomu, že porothramycin dobře absorbuje UV záření a jeho očekávané koncentrace v kultivačním médiu jsou relativně vysoké, byla k jeho detekci použita UV detekce. Hmotnostní detekce byla využita k ověření identifikace porothramycinu. Celková doba analýzy činila 10 min a retenční čas porothramycinu byl 4,8 min.

Napětí na vstupu do analyzátoru MS detektoru bylo nastaveno na 40 V a napětí na kapiláře +2800 V. Teplota bloku iontového zdroje činila 120 °C, teplota desolvatačního plynu – dusíku pak 350 °C. Průtok desolvatačního plynu byl 800 L h<sup>-1</sup>, průtok dusíku při vstupu do analyzátoru 50 L h<sup>-1</sup>. Hmotnostní spektrum v pozitivním W módu bylo měřeno v rozsahu hodnot 100–1000 *m/z*. Doba skenu byla 0,1 s, doba mezi skeny činila 0,01 s (při změně polarity, 0,3 s; pro referenční látku, 0,1 s). Jako referenční látka pro zachování přesné hmoty v průběhu měření byl použit leucine enkephalin o koncentraci 2 ng µl<sup>-1</sup> s průtokovou rychlostí 5 µl min<sup>-1</sup>.

### 3.5.3 Testované chromatografické kolony

V rámci vývoje UHPLC metody byly kromě kolony BEH C18 (viz 3.5.2) testovány další kolony. Jejich výčet a charakteristiky jsou uvedeny níže.

- Acquity BEH Phenyl (BEH Phenyl, 50 mm × 2,1 mm, 1,7 µm; Waters, USA)
- Acquity BEH RP18 (BEH Shield, 50 mm × 2,1 mm, 1,7 µm; Waters, USA)
- Acquity CSH<sup>TM</sup> C18 (CSH C18, 50 mm × 2,1 mm, 1,7 µm; Waters, USA)
- Kinetex KIN PFP (KIN PFP, 50 mm × 2,1 mm, 2,6 µm; Phenomenex, USA)
- Kinetex KIN C18 (KIN C18, 50 mm × 2,1 mm, 2,6 µm; Phenomenex, USA)

### 3.6 Stanovení biologické aktivity porothramycinu

Biologická aktivita byla zjišťována pomocí diskového difúzního testu. Disky



(terčíky) z filtračního papíru nasycené 7,5–15 µl kultivačních médií, SPE extraktů nebo izolovaných frakcí byly umístěny na kultivační misky s agarovou půdou B1, na které byla nejprve rovnoměrně rozprostřena suspenze spor citlivé bakterie *Kocuria rhizophila* CCM 552. Takto připravené misky byly kultivovány 24 h při 37 °C. Případné zóny inhibice růstu citlivého kmene vytvořené kolem disku indikovaly přítomnost biologicky aktivní látky.

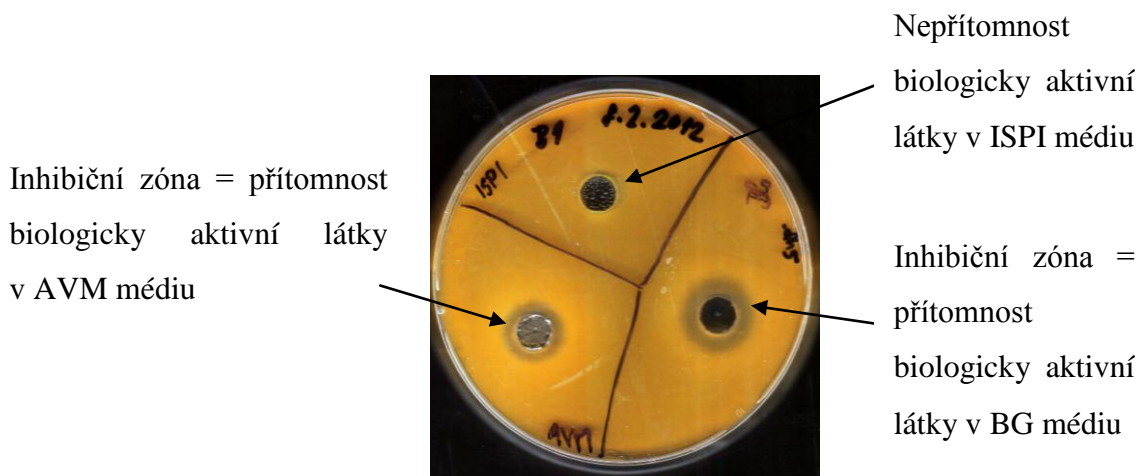
S diskovým difuzním testem byl zároveň proveden podobný test, při kterém byly do B1 agaru, na kterém byla opět rozprostřena suspenze spor *K. rhizophila*, vytvořeny otvory o průměru 0,7 cm. Do těchto otvorů bylo nanесeno 150 µl testovaného kultivačního média a za stejných podmínek proběhla kultivace. Přítomnost biologicky aktivní látky se projevila zónou kolem otvoru.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Výběr vhodného kultivačního média a bioassay

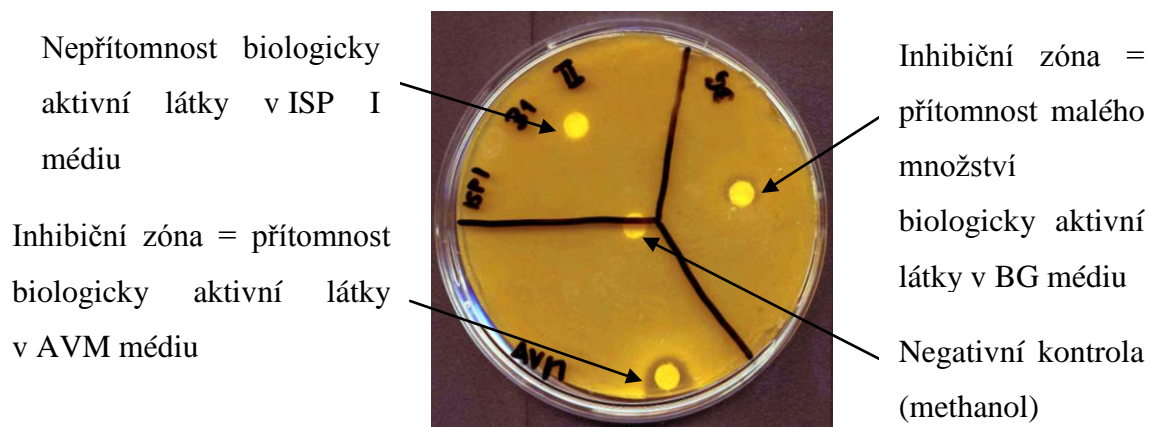
Produkce porothramycinu byla otestována na třech typech médií. Bylo použito médium AVM (viz kapitola 3.4.1), BG médium a ISP I médium, jejich složení je uvedeno v kapitole 3.2. Nejprve byla připravena očkovací kultura jednotlivých médií, tzv. I generace. V případě AVM média byla očkovací kultura kultivována v kultivačním YEME médiu (standardní postup). Poté bylo použito 5 % očkovací kultury pro zaočkování tzv. II. generace. BG a ISP I media byla použita jak pro přípravu očkovací kultury, tak pro růst II. generace.

Test na biologickou aktivitu, při kterém byly do B1 agarů vytvořeny otvory, do nichž byla nanesena jednotlivá média, potvrdil přítomnost biologicky aktivní látky v AVM a BG médiu (Obr. 7). Následné diskové difuzní testy biologické aktivity ukázaly zóny inhibice růstu citlivého kmene vytvořené kolem disků, které byly nasycené extraktem AVM média (Obr. 8). Na základě výsledků z těchto testů a získaných chromatogramů (viz kapitola 4.2) bylo jako nejvhodnější, pro růst bakterie *S. albus* a produkci porothramycinu, vybráno AVM médium.



Obr. 7 Testování biologické aktivity medií AVM, BG a ISP I

Kultivační podmínky: agarová půda B1, suspenze spor citlivé bakterie *Kocuria rhizophila* CCM 552, otvory naplněny 150  $\mu$ l médií, kultivace 24 h, 37 °C



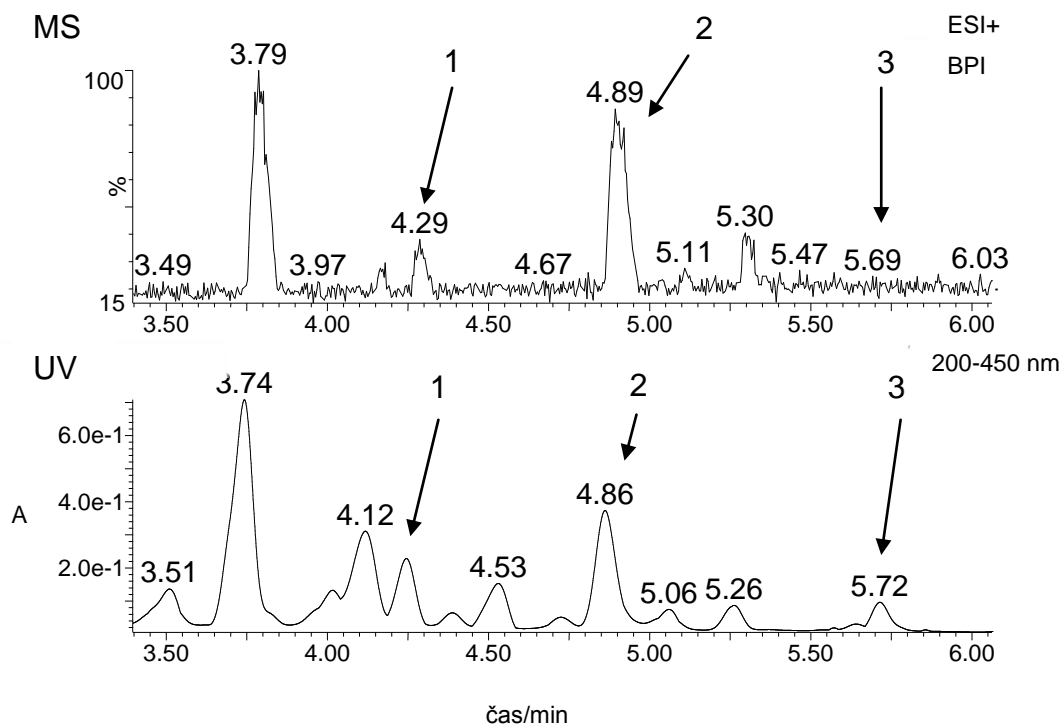
Obr. 8 Deskový difúzní test SPE extraktů AVM, BG a ISP I

Kultivační podmínky: agarová půda B1, suspenze spor citlivé bakterie *Kocuria rhizophila* CCM 552, disky nasycené 15  $\mu$ l SPE extraktů, kultivace 24 h, 37  $^{\circ}$ C

## 4.2 Identifikace porothramycinu v kultivačním médiu

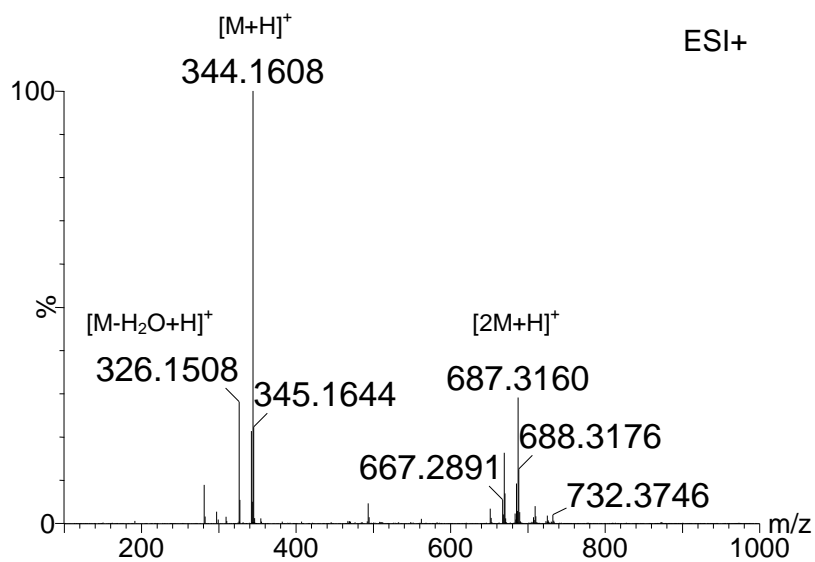
Supernatanty médií byly extrahovány metodou SPE pomocí kolonek HLB. Všechny extrakty byly poté podrobeny analýze na UHPLC-UV-MS. Detekce na hmotnostním spektrometru byla zaznamenána jak v pozitivním tak v negativním módu (ESI+ a ESI-). Na chromatogramech byly nalezeny tři píky (Obr. 9), jejichž UV spektra odpovídala porothramycinu. Hmotnostní detekce potvrdila, že jeden z píků představuje porothramycin na základě hmoty 344,1608 (monoizotopická hmotnost), která je srovnatelná s teoretickou hodnotou v pozitivním módu ESI+ 344,1610 (Obr. 10). Absorpční maxima porothramycinu kolem 235 a 335 nm odpovídala teoretickým hodnotám (Obr. 11).<sup>35</sup> Další dva píky jsou podle MS spekter analogy porothramycinu. Pík s monoizotopickou hmotou 330,1448 odpovídá látce, která vzhledem k porothramycinu postrádá jednu methylovou skupinu. To odpovídá např. 9-demethoxy-9-hydroxyporothramycinu (dmPOR). Nelze ovšem vyloučit, že se jedná o analog porothramycinu nesoucí o jeden methyl méně v N,N-dimethylamidové skupině. Látka s hmotou 301,1185 odpovídá analogu porothramycinu nesoucí místo N,N-dimethylamidové skupiny skupinu aldehydovou (daPOR). UV a MS spektra jednotlivých analogů jsou znázorněna na Obr. 12, 13. Porovnání těchto látek je shrnuto

v Tab. 3. Navržené struktury analogů porothramycinu jsou zobrazeny na Obr. 14, 15. Dále bylo možné pozorovat jednotlivé formy porothramycinu, hemiaminal a aldehyd. Při použití methanolu v mobilní fázi byla pozorovatelná i forma methoxy (podrobněji viz kapitola 4.4.1).



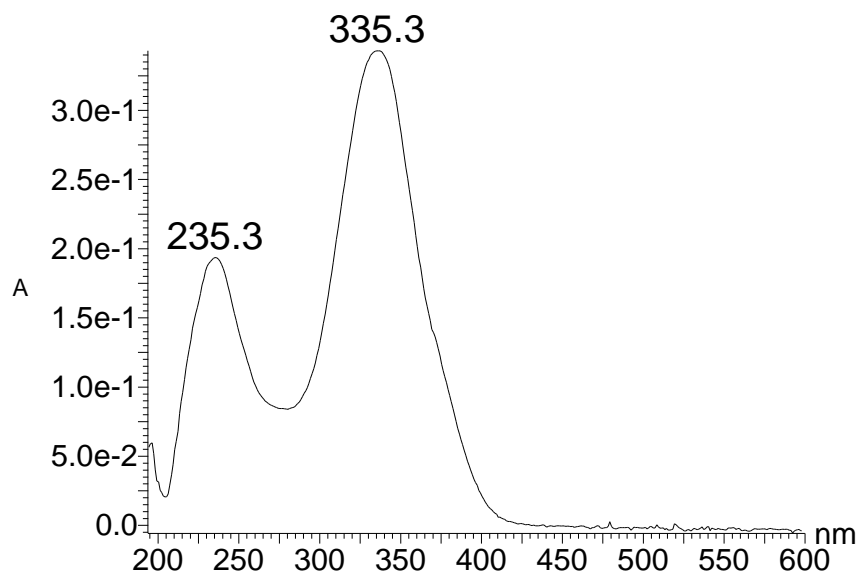
Obr. 9 Výřez UHPLC-MS-UV chromatogramu SPE extraktu AVM média

Separční podmínky: kolona Acquity UPLC BEH C18, teplota kolony 40 °C, mobilní fáze (A) 0,1% HCOOH, (B) 100% ACN s lineární gradientovou elucí (min/% acetonitrilu): 0/5; 1/5; 10/52,5; výplach kolony (1,5 min 100% B); ekvilibrace kolony (1,5 min 5% B), průtoková rychlost 0,4 ml min<sup>-1</sup>, UV detekce 200-450 nm, MS spektrum v ESI+ 100–1000 *m/z*.

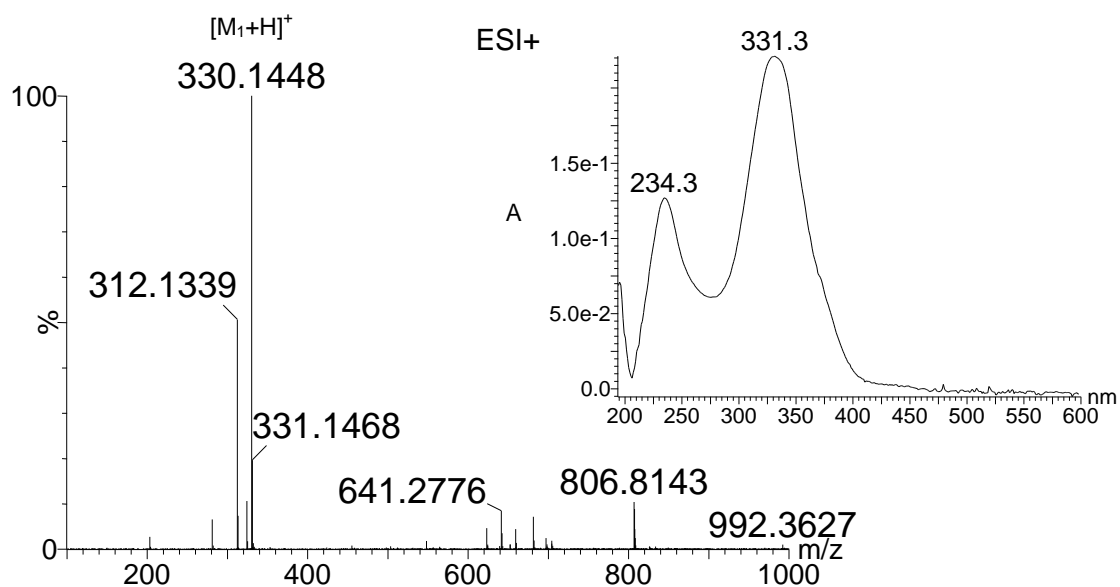


Obr. 10 MS spektrum porothramycinu (pík 2)

Poznámka: M označuje porothramycin

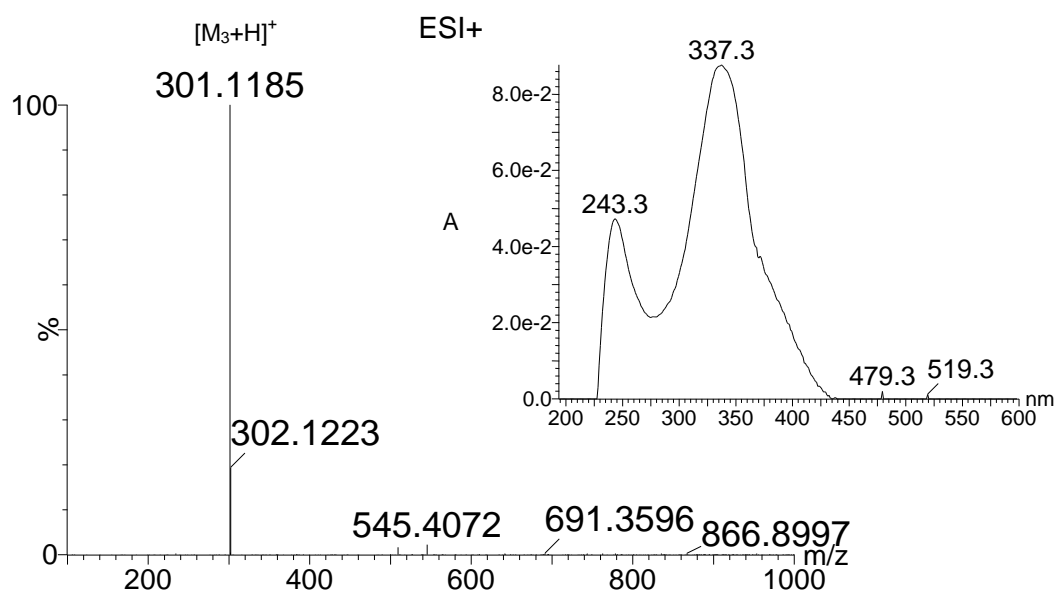


Obr. 11 UV spektrum porothramycinu (pík 2)



Obr. 12 MS a UV spektrum analogu porothramycinu dmPOR (pík 1)

Poznámka:  $M_1$  označuje dmPOR

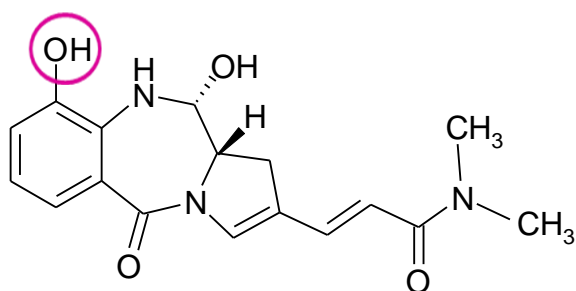


Obr. 13 MS a UV spektrum analogu porothramycinu daPOR (pík 3)

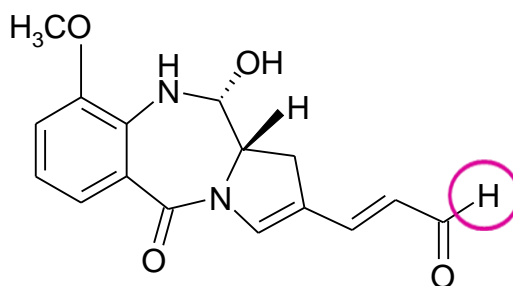
Poznámka:  $M_2$  označuje daPOR

Tab. 3 Porovnání analogů porothramycinu

| č. píku | retenční čas/min | $[M+H]^+$ v pozitivním módu | molekulární vzorec   | označení látky |
|---------|------------------|-----------------------------|----------------------|----------------|
| 1       | 4,24             | 330,1448                    | $C_{17}H_{19}N_3O_4$ | dmPOR          |
| 2       | 4,86             | 344,1608                    | $C_{18}H_{21}N_3O_4$ | Porothramycin  |
| 3       | 5,72             | 301,1185                    | $C_{16}H_{16}N_2O_4$ | daPOR          |



Obr. 14 Analog porothramycinu 9-demethoxy-9-hydroxyporothramycin (dmPOR)



Obr. 15 Analog porothramycinu nesoucí místo N,N-dimethylamidové skupiny skupinu aldehydovou (daPOR)

## 4.3 Optimalizace extrakčních metod

### 4.3.1 Vývoj rutinní extrakční metody

Pro rutinní stanovení porothramycinu byly testovány metody SPE i LLE. Nejdůležitějším krokem pro vývoj SPE metody je určení vhodného sorbentu. Tyto SPE

postupy byly následně porovnány s LLE. Použité sorbenty a jednotlivé postupy jsou shrnuté v následující Tab. 4.

Tab. 4 Postupy rutinních extrakčních metod (I. část)

|              | <b>Postup I pro OASIS MCX 60 mg</b>                | <b>Postup II pro OASIS MCX 60 mg</b>  |
|--------------|--|---|
| kondicionace | 3 ml methanol                                      | 3 ml methanol   |
| ekvilibrace  | 3 ml voda  | 3 ml voda   |
| vzorek       | 2 ml okyselený vzorek                              | 2 ml okyselený vzorek   |
| promytí      | 3 ml 2 % mravenčí kyselina<br>1 ml + 2 ml methanol | 3 ml voda, 3 ml methanol<br>1 ml fosfát/citrátový pufr pH =<br>= 7,80 - methanol (50:50, v/v) |
| eluce        | 1 ml amoniak – methanol (5:95, v/v)                | 1 ml amoniak - methanol (1:99, v/v)   |

Tab. 4 Postupy rutinních extrakčních metod (II. část)

|              | <b>Postup pro OASIS HLB 60 mg</b> | <b>Postup pro LLE</b>                  |
|--------------|-----------------------------------|--|
| kondicionace | 3 ml methanol                     |  |
| ekvilibrace  | 3 ml voda                         |  |
| vzorek       | 2 ml vzorek                       | viz 3.4.2 za použití menších<br>objemů |
| promytí      | 3 ml voda                         |  |
| eluce        | 1 ml methanol                     |  |

Nejprve byly použity kolonky Oasis MCX 60 mg. Při jejich použití postupem I, který je obecným protokolem pro tento sorbent, bylo získáno nepatrné množství porothramycinu již ve frakcích při promývání methanolem. Při postupu II, který byl vyvinutý pro extrakci sibiromycinu<sup>11</sup>, nedošlo k žádnému zachycení na sorbentu. Důvodem zřejmě bude to, že sibiromycin narozdíl od porothramycinu obsahuje ionizovatelnou aminovou skupinu. Součástí struktury porothramycinu (viz kapitola 2.2) je sice amidová skupina, ta ovšem není dostatečně bazická a nezajistí tak zachycení porothramycinu na sorbentu.

Při použití kolonek Oasis HLB 60 mg došlo k zachycení porothramycinu na sorbentu. Při použití LLE nebylo docíleno takové výtěžnosti jako při SPE pomocí



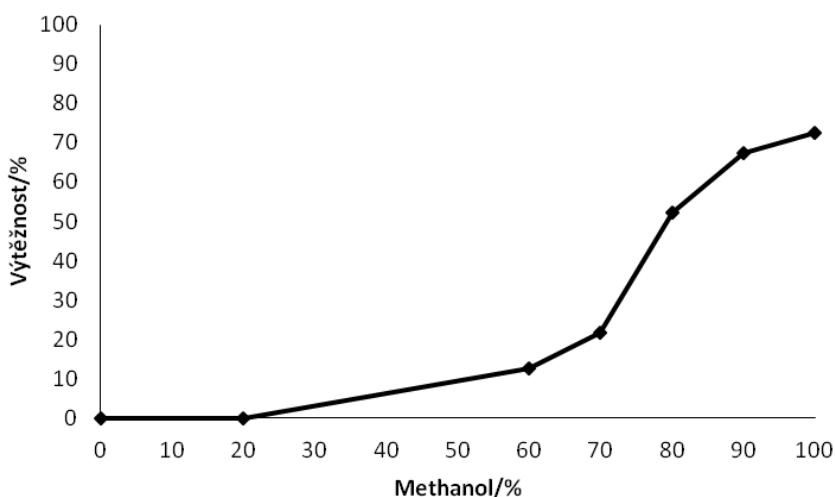
kolonek Oasis HLB 60 mg. Na základě těchto výsledků byla jako optimální extrakční metoda vybrána SPE právě pomocí kolonek Oasis HLB 60 mg, jejichž sorbent je kopolymerní styren-divinylbenzenová pryskyřice s navázaným vinylpyrrolidonem pro extrakci polárních látek.

#### 4.3.1.1 Eluční profil

Pro SPE pomocí kolonek Oasis HLB 60 mg byl sestaven graf elučního profilu pro finální koncentraci  $31,25 \text{ mg ml}^{-1}$  v AVM médiu (Obr. 16). Jelikož byl vzorek po SPE  $10\times$  zakoncentrovaný, byl do média pro SPE přidán porothramycin o koncentraci  $3,125 \text{ mg ml}^{-1}$ .

Eluční profil je závislost výtěžnosti na koncentraci methanolu v elučním kroku SPE. Postup SPE je uveden výše v Tab. 4 (II. část). Eluce byla provedena vodou (0%) a dále 20%; 60%; 70%; 80%; 90% a 100% methanolem.

Nejvyšší výtěžnosti 72,4 % bylo dosaženo při eluci 100% methanolem. Na základě tohoto výsledku byl porothramycin z SPE kolony ve výsledné metodě eluován 100% methanolem.



Obr. 16 Eluční profil

#### 4.3.1.2 Výtěžnost SPE metody

Výtěžnost SPE metody je dána poměrem množství analytu získaného pomocí SPE k referenční hodnotě koncentrace. Pro zjištění výtěžnosti SPE metody byly provedeny

extrakce vzorků o známé koncentraci porothramycinu přidaných do média, které neobsahovalo porothramycin. Výtěžnost byla měřena pro tři koncentrační hladiny 7,81; 31,25 a 250,00 mg ml<sup>-1</sup> a každá koncentrační hladina byla testována šestkrát. Počáteční koncentrace porothramycinu přidaného do média byla 10× nižší, protože právě tolikrát byly vzorky během SPE prekoncentrovány.

Ze získaných výsledků byla vypočtena výtěžnost SPE metody. Při koncentraci porothramycinu 7,81 mg ml<sup>-1</sup> vyšla hodnota výtěžnosti  $51,88 \pm 4,39$  %, na koncentrační hladině 31,25 mg ml<sup>-1</sup> měla hodnotu  $63,56 \pm 1,99$  % a při koncentraci porothramycinu 250,00 mg ml<sup>-1</sup> byla výtěžnost  $70,02 \pm 3,26$  %.

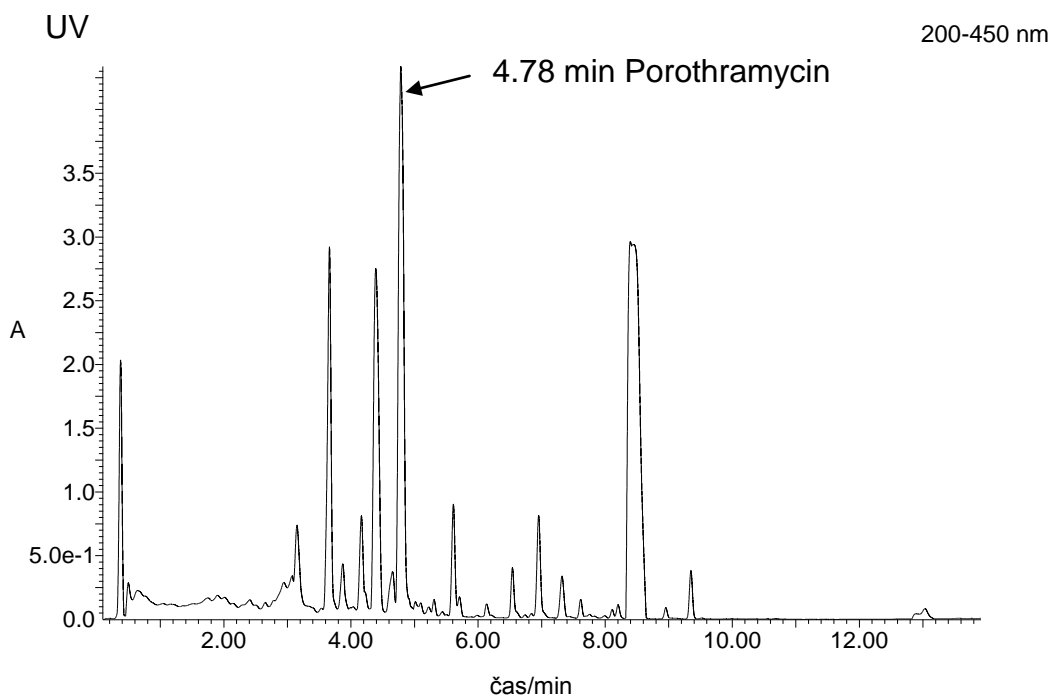
#### 4.3.2 Vývoj extrakce pro přípravu standardu porothramycinu

Pro přípravu standardu porothramycinu bylo potřeba izolovat větší množství této látky, a to minimálně 1 mg. Za tímto účelem bylo nutné vyvinout extrakční metodu pro zpracovávání velkého objemu kultivačního média. Byly vyzkoušeny postupy jak pomocí SPE tak pomocí LLE. Nejprve byl testován stejný sorbent, který byl nejvhodnější pro rutinní extrakci, pouze na větší kolonce s větším množstvím sorbentu, Oasis HLB 200 mg. Tato metoda byla dále srovnána s dalšími extrakčními metodami, které jsou uvedeny níže v Tab 5.

Tab. 5 Postupy extrakčních metod pro přípravu standardu porothramycinu

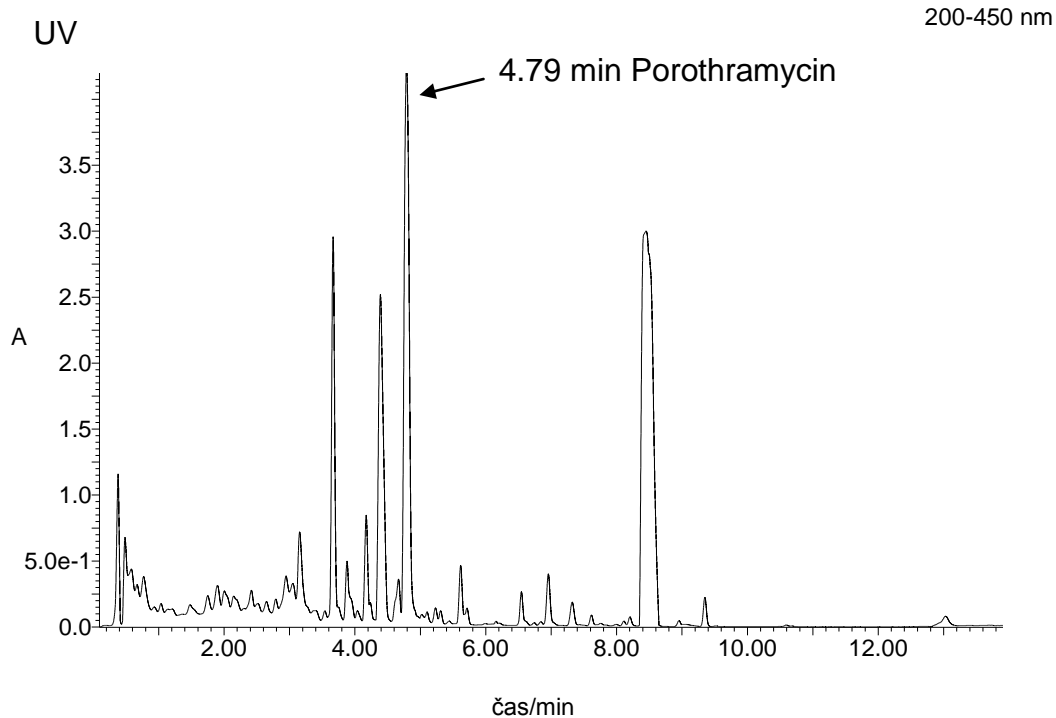
|              | <b>Postup pro OASIS HLB 200 mg<br/>(SPE)</b>                        | <b>Postup pro extrakci pomocí<br/>amberlitu (SPE)</b> |
|--------------|---|---|
| kondicionace | 15 ml methanol  | 2 × 20 ml ethanol                                     |
| ekvilibrace  | 15 ml voda  | 2 × 20 ml voda  |
| vzorek       | 10 ml vzorek  | 20 ml vzorek  |
| promytí      | 15 ml voda  | 2 × 20 ml voda  |
| Eluce        | 5 ml methanol   | 2 × 10 ml etanol                                      |
|              | <b>Postup pro extrakci pomocí<br/>hexanu a dichlormethanu (LLE)</b> |   |
|              | viz 3.4.2   |   |

Extrakcí pomocí SPE na kolonkách Oasis HLB (Obr. 17) dochází k vyextrahování požadované látky stejně tak jako při použití amberlite® XAD-4 (Obr. 18). Při srovnání obou těchto SPE a vyvinuté metody LLE (Obr. 19) bylo možné pozorovat daleko větší čistotu extraktu právě pomocí LLE, ale výtěžnost byla nepatrně nižší. Jelikož je pro přípravu standardu porothramycinu důležitější čistota než výtěžnost, byla pro získání standardu vybrána LLE.



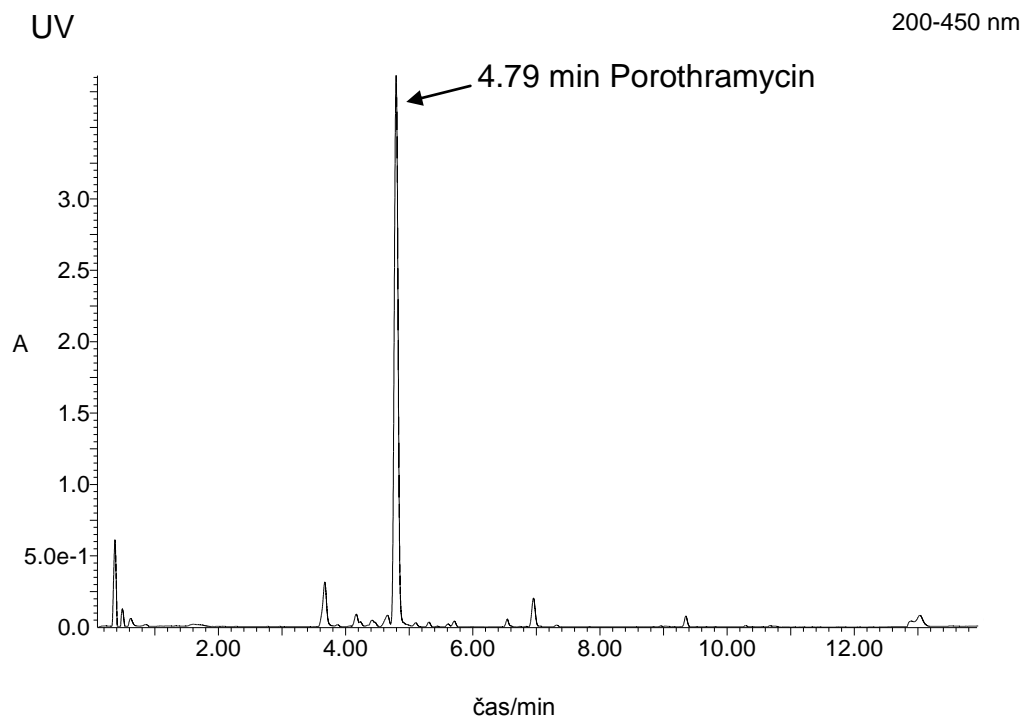
Obr. 17 UHPLC-UV analýza extraktu pomocí SPE na kolonkách Oasis HLB 200 mg

Separační podmínky: totožné s podmínkami uvedenými u Obr. 9



Obr. 18 UHPLC-UV analýza extraktu pomocí amberlitu

Separační podmínky: totožné s podmínkami uvedenými u Obr. 9



Obr. 19 UHPLC-UV analýza extraktu pomocí LLE

Separační podmínky: totožné s podmínkami uvedenými u Obr. 9

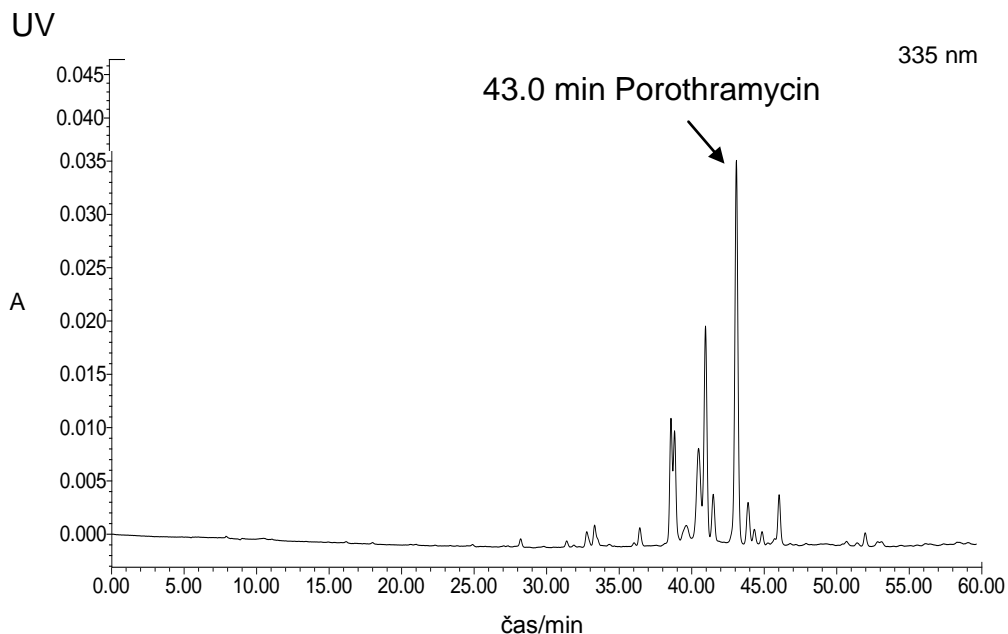
## 4.4 Optimalizace instrumentálních metod

### 4.4.1 Vývoj preparativní HPLC

Pro přípravu standardu porothramycinu byla použita metoda preparativní HPLC, jak již bylo popsáno v kap. 3.3.3. Při vývoji této metody byla použita pouze jedna kolona, a to Luna C18 (250 mm × 15 mm, 5 μm; Phenomenex, USA), která poskytovala dostatečnou separaci.

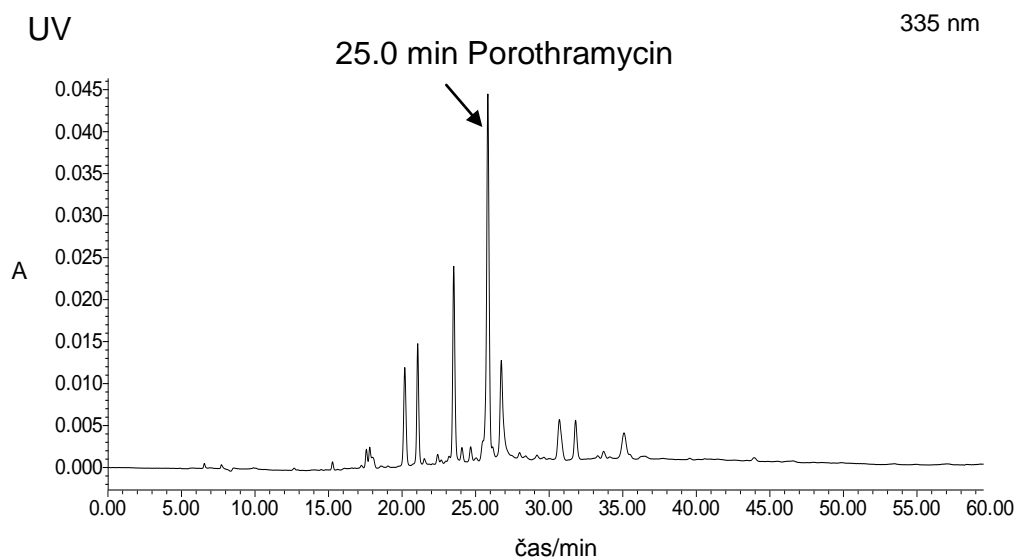
LLE extrakty byly analyzovány pomocí gradientové metody, kdy se za 60 min lineárně změnil poměr A:B 90:10 (v/v) na poměr A:B 0:100 (v/v). Nejprve byla jako mobilní fáze použita 0,1% mravenčí kyselina (A) se 100% methanolem (B). Při použití methanolu byl retenční čas porothramycinu 43 min (Obr. 20). Proto byl methanol nahrazen 100% acetonitrilem. S použitím acetonitrilu se retenční čas zkrátil na 25 min (Obr. 21).

Izokratická eluce, která nevyžaduje prodlevy při ekvilibraci, se proto testovala s 0,1% mravenčí kys. (A) a acetonitrilem (B). Použité metody jsou shrnuty v Tab. 6.



Obr. 20 HPLC-UV s gradientovou elucí, mobilní fáze 0,1% mravenčí kys. a 100% methanol

Separační podmínky: kolona Phenomenex Luna C18, lineární gradientová eluce (min/% methanolu):  
0/10; 60/100, průtoková rychlost 4 ml min<sup>-1</sup>, UV detekce 335 nm



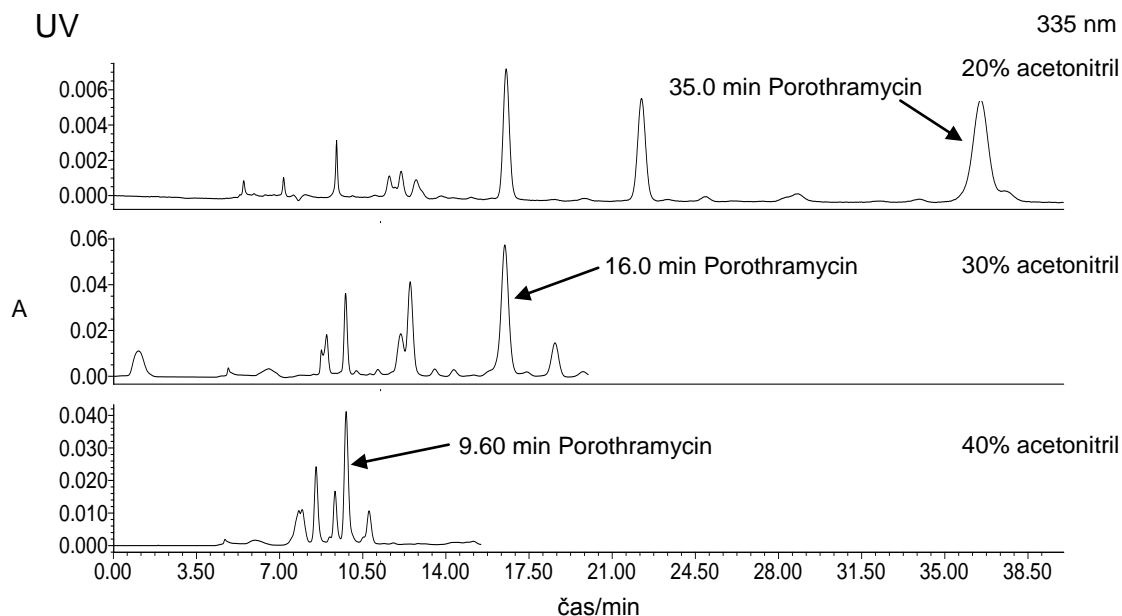
Obr. 21 HPLC-UV s gradientovou elucí, mobilní fáze 0,1% mravenčí kys. a 100% acetonitril

Separační podmínky: kolona Phenomenex Luna C18, lineární gradientová eluce (min/% acetonitrilu): 0/10; 60/100, průtoková rychlost 4 ml min<sup>-1</sup>, UV detekce 335 nm

Tab. 6 Poměry složek mobilní fáze při izokratickém módu

| metoda | %A | %B |
|--------|----|----|
| 1      | 60 | 40 |
| 2      | 70 | 30 |
| 3      | 80 | 20 |

Separační podmínky: kolona Phenomenex Luna C18, mobilní fáze (A) 0,1% HCOOH, (B) 100% ACN, průtoková rychlost 4 ml min<sup>-1</sup>, UV detekce 335 nm.

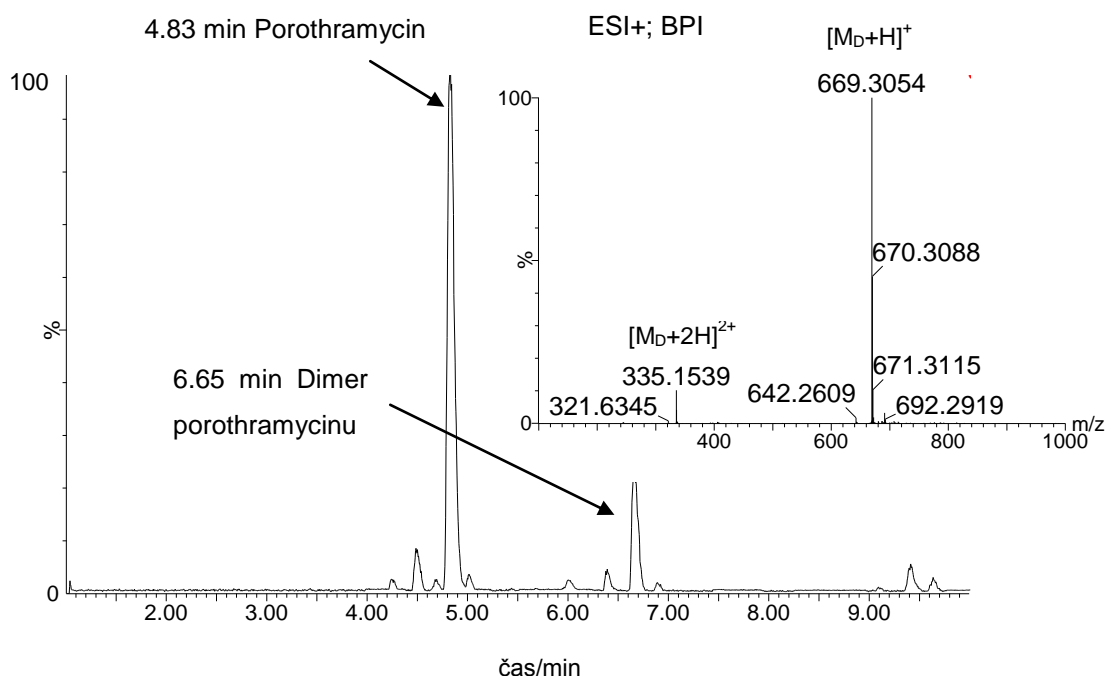


Obr. 22 HPLC-UV s izokratickou elucí, poměr A:B 80:20; 70:30; 60:40 (v/v)

Separční podmínky: kolona Phenomenex Luna C18, mobilní fáze (A) 0,1% HCOOH, (B) 100% ACN, průtoková rychlost 4 ml min<sup>-1</sup>, UV detekce 335 nm

Na výše uvedeném Obr. 22 jsou porovnány chromatogramy měřené v izokratickém módu. S klesajícím zastoupením acetonitrilu (B) klesala výška píku a prodloužil se retenční čas porothramycinu. Dostatečné separace za vyhovujícího retenčního času bylo dosaženo při poměru A:B 70:30 (v/v), retenční čas byl 16 min.

Touto metodou bylo možné izolovat porothramycin, ovšem po následném odpaření a rekonstituci frakcí bylo analýzou izolovaných frakcí porothramycinu pomocí UHPLC-UV-MS zjištěno, že kromě porothramycinu obsahují značné množství látky odpovídající podle MS spektra dimeru porothramycinu (Obr. 23).



Obr. 23 UHPLC-MS chromatogram dimeru porothramycinu a jeho MS spektrum

Poznámka:  $M_D$  označuje dimer porothramycinu

Separační podmínky: teplota kolony 40 °C, mobilní fáze (A) 0,1% HCOOH, (B) 100% ACN s lineární gradientovou elucí (min/% acetonitrilu): 0/5; 1/5; 10/52,5; výplach kolony (1,5 min 100% B); ekvilibrace kolony (1,5 min 5% B), průtoková rychlost 0,4 ml min<sup>-1</sup>, UV detekce 335 nm, MS spektrum v pozitivním W módu 100–1000 m/z.

Aby se zabránilo nežádoucímu vzniku dimeru, byly vyzkoušeny následující modifikace. Nejprve byl před odpařením izolované frakce přidán amoniak, aby došlo k zneutralizování mravenčí kyseliny obsažené v mobilní fázi. Po odpaření byla frakce rozpuštěna v methanolu a změřena na UHPLC-UV-MS jako v předchozím případě. Ani tento postup však nezabránil vzniku dimeru. Proto byla 0,1% mravenčí kyselina nahrazena 1mM mravenčanem amonným o pH = 4,00. Při použití této mobilní fáze již dimer porothramycinu nevznikal. K získání standardu porothramycinu se proto měřilo izokratickou metodou s použitím mobilních fází 1mM mravenčan amonný o pH = 4,00 (A) se 100% acetonitrem (B) v poměru A:B 70:30 (v/v). Jako optimální průtoková rychlost byla zvolena 4 ml min<sup>-1</sup> a UV detekce při 336 nm. Celkový čas analýzy činil 20 min, retenční čas porothramycinu byl 16 min.

Touto optimální HPLC metodou, které předcházela LLE, se získalo 1,7 mg čistého standardu, který sloužil pro potřeby validace UHPLC metody.

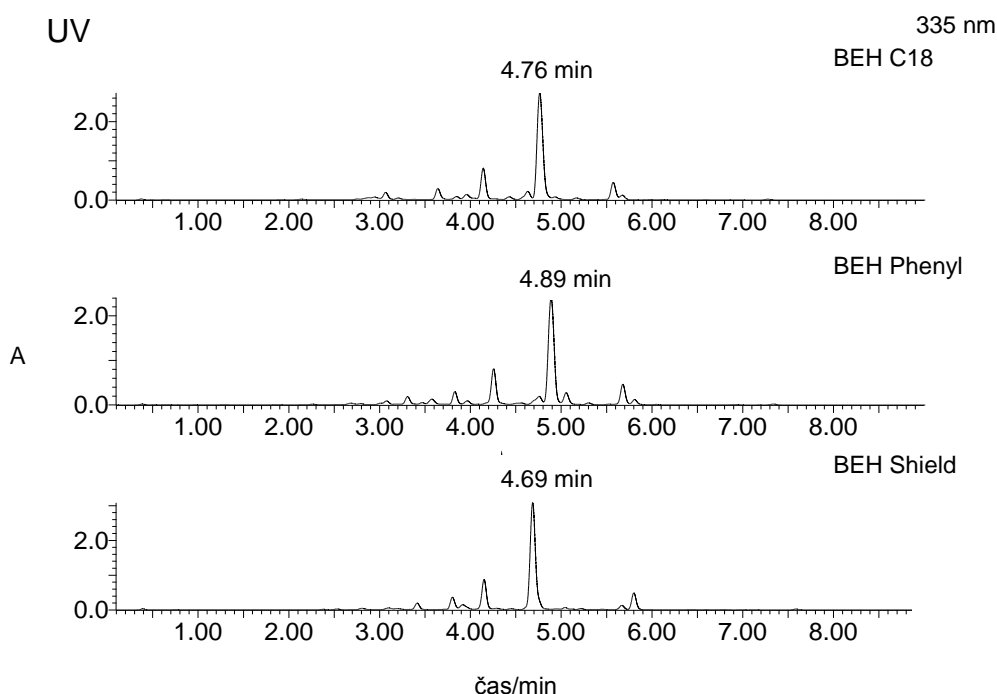


#### 4.4.2 Vývoj UHPLC metody

Jedním z cílů této práce bylo vyvinout metodu stanovení porothramycinu pomocí UHPLC-UV-MS pro analýzy při mikrobiologických a genetických experimentech. Proto byla potřeba otestovat různé typy kolon, mobilních fází a dalších chromatografických podmínek (teplota kolony, izokratická metoda, gradientový program). Pozornost byla věnována také podmínkám MS detekce.

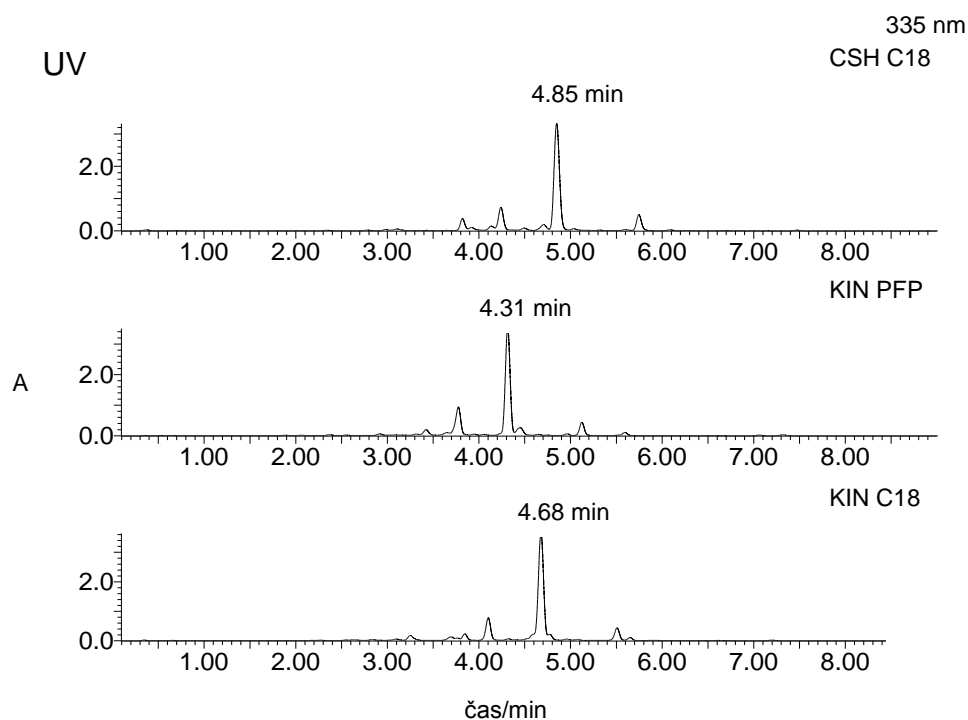
##### 4.4.2.1 Testování UHPLC kolon

V prvním kroku byly testovány UHPLC kolony, a to BEH C18, BEH Phenyl, BEH Shield, CSH C18, KIN PFP a KIN C18. Srovnání těchto analýz je znázorněno na Obr. 24 a 25. Retenční časy porothramycinu byly téměř identické, při použití KIN PFP byl nepatrně kratší. K nejlepšímu oddělení minoritních interferujících látek od porothramycinu bylo docíleno při použití kolony BEH C18 a BEH Shield. Za nejoptimálnější kolonu byla zvolena BEH C18, jelikož je označována za univerzální kolonu a bývá v analytických laboratořích nejběžnější.



Obr. 24 UHPLC-UV analýza při použití kolon BEH C18, BEH Phenyl a BEH Shield (píky s označeným retenčním časem odpovídají porothramycinu)

Separační podmínky: teplota kolony 40 °C, mobilní fáze (A) 0,1% HCOOH, (B) 100% ACN s lineární gradientovou elucí (min/% acetonitrilu): 0/5; 1/5; 10/52,5; výplach kolony (1,5 min 100% B); ekvilibrace kolony (1,5 min 5% B), průtoková rychlost 0,4 ml min<sup>-1</sup>, UV detekce 335 nm



Obr. 25 UHPLC-UV analýza při použití kolony CSH C18, KIN PFP a KIN C18 (píky s označeným retenčním časem odpovídají porothramycinu)

Separční podmínky: teplota kolony 40 °C, mobilní fáze (A) 0,1% HCOOH, (B) 100% ACN s lineární gradientovou elucí (min/% acetonitrilu): 0/5; 1/5; 10/52,5; výplach kolony (1,5 min 100% B); ekvilibrace kolony (1,5 min 5% B), průtoková rychlost 0,4 ml min<sup>-1</sup>, UV detekce 335 nm

#### 4.4.2.2 Testování mobilních fází

Dále bylo na koloně BEH C18 testováno vhodné složení mobilní fáze. V reversním módu kapalinové chromatografie se jako mobilní fáze používá vodná složka (roztok organické kyseliny, pufr nebo pouze voda) v kombinaci s organickým modifikátorem, nejčastěji acetonitril nebo methanol. Testované složení mobilních fází je uvedeno v Tab. 7.

Tab. 7 Složení mobilních fází

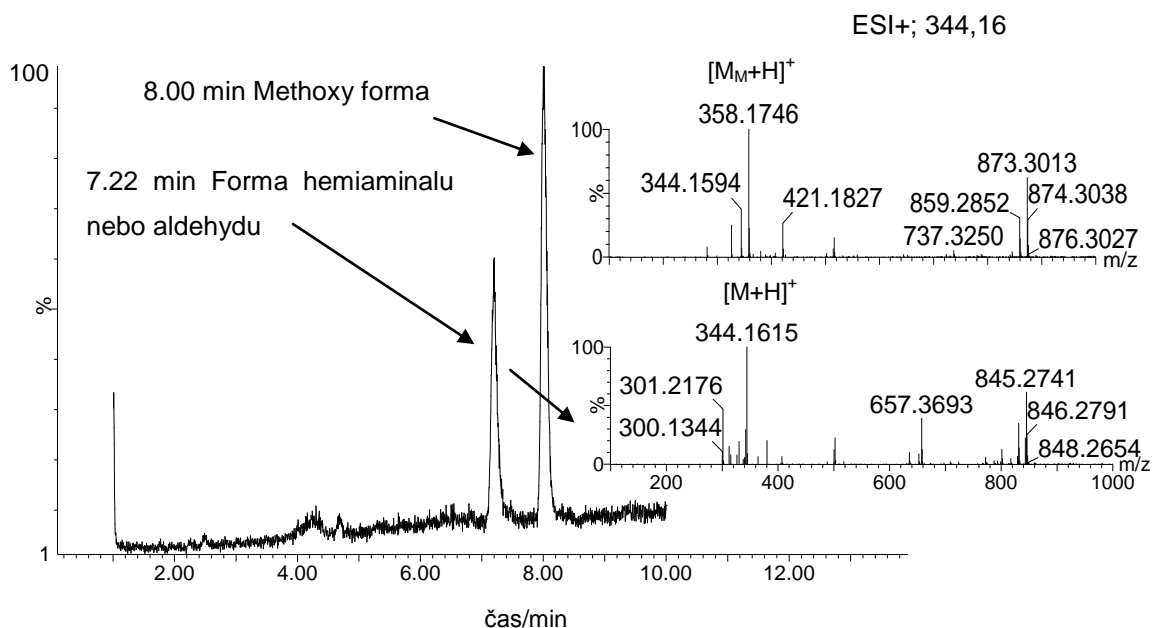
| mobilní fáze          |   |
|-----------------------|---|
| organický modifikátor | vodná složka                                |
| Methanol              | 0,1 % HCOOH                                 |
|                       | 0,1 % CF <sub>3</sub> COOH                  |
| Acetonitril           | 0,1 % HCOOH                                 |
|                       | 0,1 % CF <sub>3</sub> COOH                  |
|                       | 1mM HCOONH <sub>4</sub> pH 4                |
|                       | 1mM HCOONH <sub>4</sub> pH 9                |
|                       | 1mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> pH 5 |
|                       | 1mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> pH 9 |

Při použití methanolu docházelo vedle hemiaminal nebo aldehyd formy (tyto formy nejsme schopni rozlišit, protože mají identickou hmotnost) také ke vzniku methoxy formy porothramycinu, jak je znázorněno na Obr. 26. Současně se porothramycin v případě použití methanolu jako organického modifikátoru eluoval relativně pozdě, retenční čas porothramycinu ve formě hemiaminalu nebo aldehydu činil 7,22 min a v methoxy formě byl 8,00 min. Dále byla pozorována velmi nízká odezva při MS detekci. Volba vodné složky (testovány byly 0,1% kyselina mravenčí a 0,1% trifluoroctová kyselina) neměla na výše popsání pozorování vliv.

Delší retenční čas a velice nízká odezva při MS detekci vedla k nahrazení methanolu acetonitrilem. Při použití acetonitrilu s 0,1% mravenčí kyselinou i 0,1% kyselinou trifluoroctovou došlo ke zkrácení retenčního času. Odezvy hmotnostní detekce se v porovnání s methanolem zvýšily až o řád. Poté byly vyzkoušeny další vodné fáze. K nejlepší separaci a odezvě docházelo při použití acetonitrilu s 0,1% mravenčí kyselinou (plocha píku  $1,92 \cdot 10^6$  min). Při použití 0,1% kyseliny trifluoroctové, docházelo sice k dobré separaci, ale nižší odezvě při MS detekci (plocha píku  $1,67 \cdot 10^6$  min). Při použití 1mM mravenčanu amonného o pH = 4,00 se plocha píku zvětšila v důsledku nedokonalé separace (plocha píku  $2,89 \cdot 10^6$  min). Pokud se použil spolu s acetonitrilem 1mM octan amonný o pH = 5,00 i pH = 9,00 (plochy píků  $9,84 \cdot 10^5$  min;  $6,61 \cdot 10^5$  min) nebo 1mM mravenčan amonný o pH = 9,00 (plocha píku  $6,48 \cdot 10^5$  min), dala se pozorovat nedostatečná separace a jeho MS odezva výrazně

poklesla. Což mohlo být způsobené vyšším pH mobilních fází.

Nejoptimálnější mobilní fáze byla, na základě těchto výsledků, složena ze 100% acetonitrilu a 0,1% mravenčí kyselina.



Obr. 26 UHPLC-MS při použití mobilní fáze 0,1% mravenčí kys. a 100% methanol

Poznámka:  $M_M$  označuje methoxy formu porothramycinu

Separací podmínky:  $t_{kolony}$  40 °C, lineární gradientová eluce (min/% methanolu): 0/5; 1/5; 10/52,5; výplach kolony (1,5 min 100% B); ekvilibrace kolony (1,5 min 5% B), průtoková rychlost 0,4 ml min<sup>-1</sup>, průtoková rychlost 0,4 ml min<sup>-1</sup>, MS spektrum v pozitiv. W módu 100–1000  $m/z$ .

#### 4.4.2.3 Testování teploty kolony BEH C18

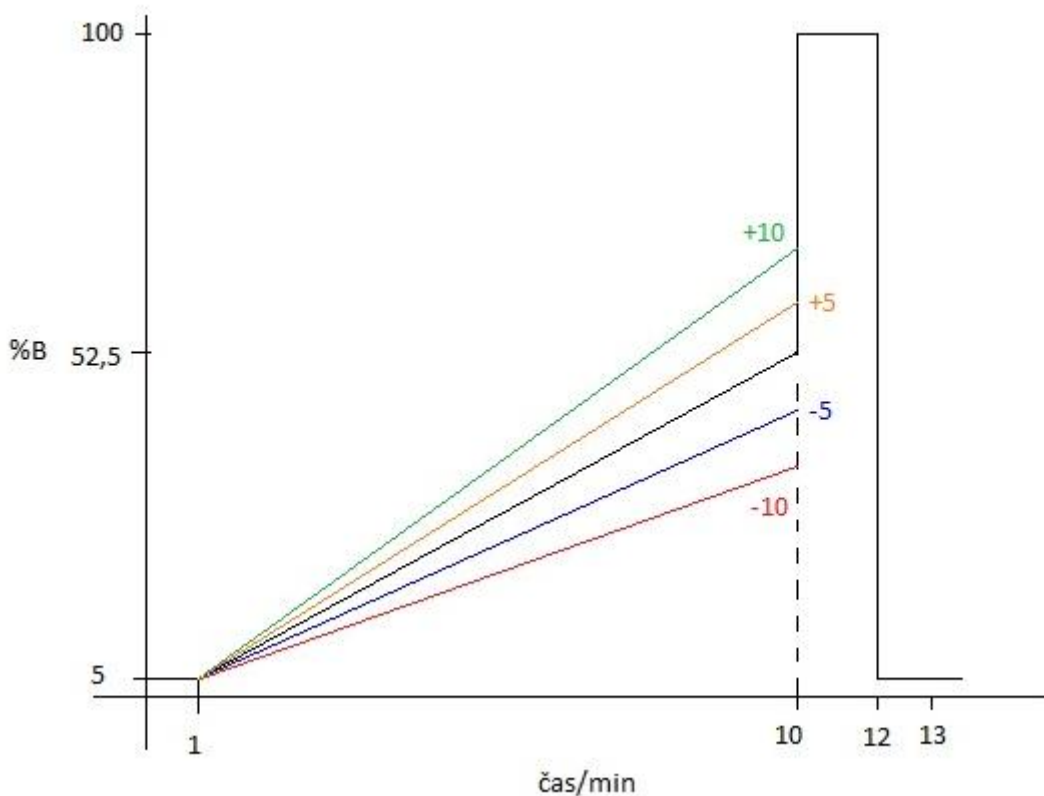
V dalším optimalizačním kroku se testovala teplota kolony BEH C18. Maximální doporučená teplota kolony by neměla přesáhnout 55 °C. Byly testovány teploty 30, 40 a 50 °C. Byl sledován vliv na retenční čas porothramycinu, odezvu na UV detektoru a separaci. S vyšší teplotou se retenční čas prakticky nezměnil. Ale při teplotě 30 °C nedošlo k dokonalé separaci. Nejvyšší odezvy na UV detektoru bylo dosaženo při teplotě 40 °C. Proto byla zvolena jako optimální teplota kolony 40 °C.

#### 4.4.2.4 Testování elučního programu

Poslední fáze optimalizace se týkala testování elučního programu / elučního módu. Při gradientové eluci vzrůstá eluční síla mobilní fáze během analýzy, zatímco při

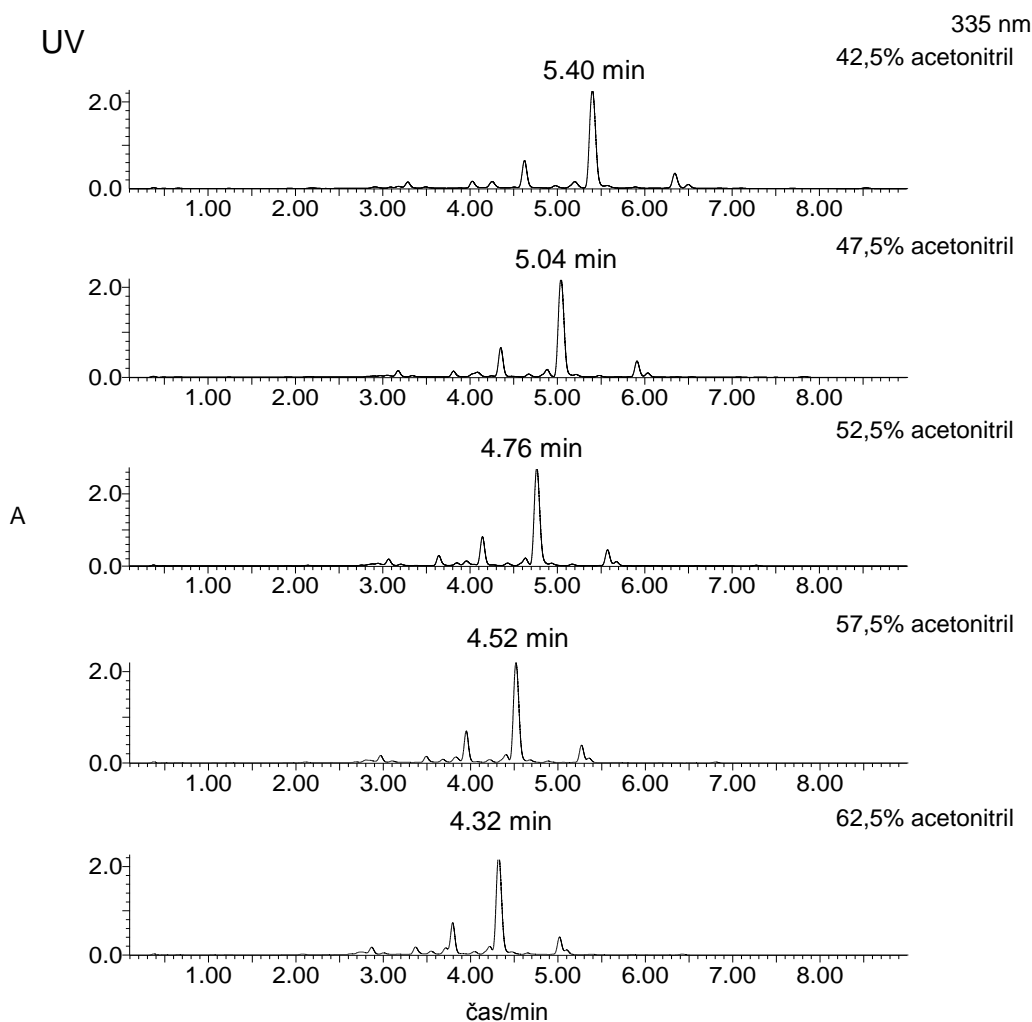
izokratické eluci se složení mobilní fáze (eluční síla) během analýzy nemění. Mobilní fáze byla složena ze 100% acetonitrilu a 0,1% mravenčí kyselina s lineární gradientovou elucí (min/% acetonitrilu): 0/5; 1/5; 10/52,5; 12/100; 13/5. ; výplach kolony (12 min 100% acetonitrilem); ekvilibrace kolony (13 min 5% acetonitrilem).

Tato gradientová metoda byla modifikována v 10 min analýzy, kdy byly testovány následující hodnoty acetonitrilu (složka B): 42,5; 47,5; 52,5; 57,5; 62,5 %. Tyto změny jsou znázorněny na Obr. 27. Ostatní separační podmínky zůstaly nezměněné.



Obr. 27 Grafické znázornění modifikace gradientové metody

Na následujících chromatogramech (Obr. 28) jsou porovnány jednotlivé gradientové metody. Vyplývá z nich, že s rostoucím procentem acetonitrilu v mobilní fázi se dle očekávání zkracuje retenční čas porothramycinu. Naopak, pokud je poměr acetonitrilu v 10. minutě nižší, dochází k lepší separaci píků. Podstatné zlepšení původní gradientové metody uvedenou modifikací nebylo zjištěno. Na základě krátkého retenčního času porothramycinu bylo však možné dobu analýzy optimálně zkrátit a je shrnuta v Tab. 8.



Obr. 28 UHPLC-UV, modifikace gradientu v 10 min 42,5; 47,5; 52,5; 57,5; 62,5% acetonitril (píky s označeným retenčním časem odpovídají porothramycinu)

Separční podmínky: teplota kolony 40 °C, mobilní fáze (A) 0,1% HCOOH, (B) 100% ACN s lineární gradientovou elucí (min/% acetonitrilu): 0/5; 1/5; 10/42,5 (47,5; 52,5; 57,5; 62,5); výplach kolony (1,5 min 100% B); ekvilibrace kolony (1,5 min 5% B), průtoková rychlost 0,4 ml min<sup>-1</sup>, UV detekce 335 nm

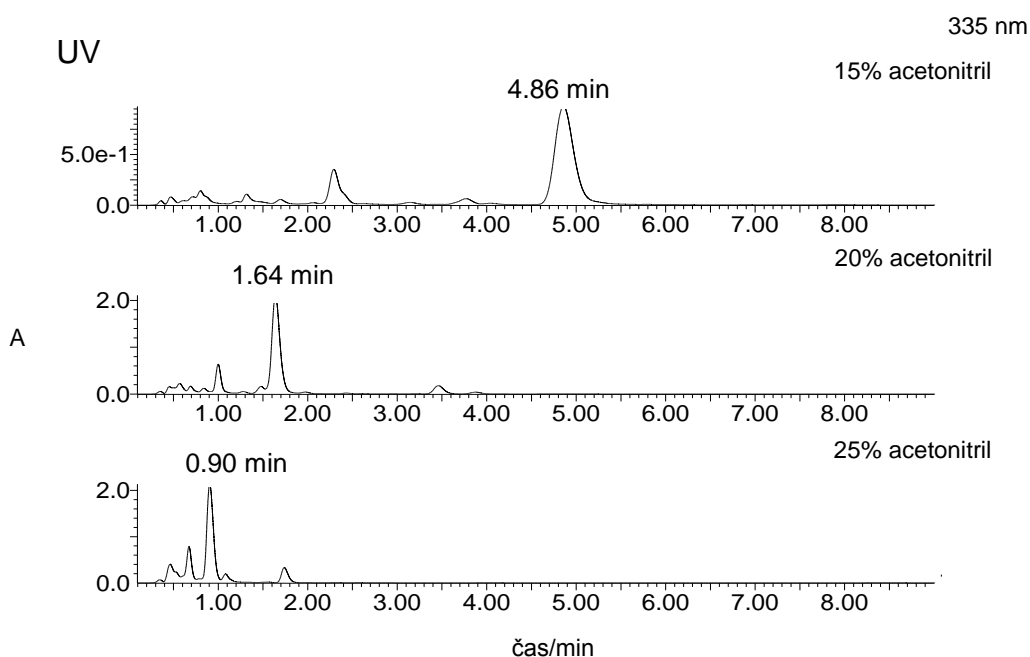
Tab. 8 Optimalizovaná gradientová metoda

| čas/min | %A   | %B   |
|---------|------|------|
| 0       | 95   | 5    |
| 1       | 95   | 5    |
| 6       | 68,5 | 31,5 |
| 7,5     | 0    | 100  |
| 9       | 95   | 5    |

Separční podmínky: kolona Acquity UPLC BEH C18, teplota kolony 40 °C, mobilní fáze (A) 0,1% HCOOH, (B) 100% ACN, průtoková rychlost 0,4 ml min<sup>-1</sup>, UV detekce 335 nm.

Po vývoji gradientové metody byla testována i metoda izokratická. Byly použity stejné mobilní fáze jako u gradientové metody. Mobilní fáze byla nejprve tvořena 25% acetonitrilem. Ostatní chromatografické podmínky zůstaly také stejné jako při gradientové eluci. Tato izokratická metoda byla poté modifikována 20% a 15% acetonitrilem.

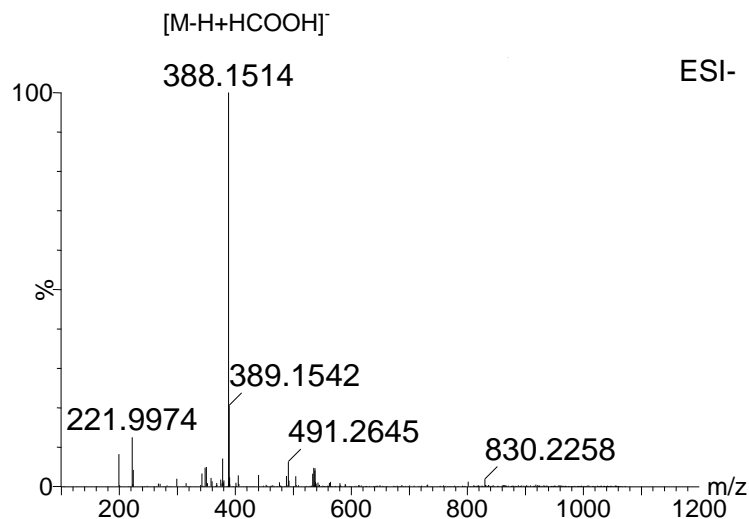
Ze získaných chromatogramů bylo patrné, že izokratické metody nejsou pro analýzu porothramycinu tak vhodné jako gradientová metoda. Nedochozí při nich k dokonalé separaci nebo odezvě na UV detektoru. Chromatogramy jsou uvedeny Obr. 29.



Obr. 29 UHPLC-UV, izokratická eluce 15; 20 a 25% acetonitril (píky s označeným retenčním časem odpovídají porothramycinu)

Separční podmínky: kolona Acquity UPLC BEH C18, teplota kolony 40 °C, mobilní fáze (A) 0,1% HCOOH, (B) 100% ACN, izokratická eluce 15; 20 a 25% acetonitrilu, průtoková rychlost 0,4 ml min<sup>-1</sup>, UV detekce 335 nm.

Po těchto krocích následovala optimalizace MS podmínek při gradientové eluci. V pozitivním módu ESI<sup>+</sup>, byly detekční odezvy vyšší než při měření v negativním módu ESI<sup>-</sup>, při kterých byl navíc majoritním píkem adukt analytu s mravenčí kyselinou pocházející z mobilní fáze. MS spektrum v ESI<sup>-</sup> je uvedeno na Obr. 30 (ESI<sup>+</sup> viz kapitola 4.2).



Obr. 30 MS spektrum aduktu porothramycinu s mravenčí kyselinou

V ESI+ byly nejprve testovány hodnoty napětí na kapiláře, 2400; 2600; 2800; 3000; 3200 a 3400 V (ostatní podmínky zůstaly nezměněné). Těmito změnami však byly získány velice podobné odezvy na MS detektoru, plochy píků odpovídaly následujícím hodnotám, 397,97; 335,69; 359,55; 346,98; 354,42 a 348,71 min. Původní hodnota napětí na kapiláře 2800 V byla ponechána beze změny. Poté bylo testováno napětí na vstupu do analyzátoru. Testovaly se tyto hodnoty: 10; 20; 40; 60 a 80 V. Ani v tomto případě nedošlo ke výraznému zlepšení, odezvy byly prakticky srovnatelné. Plochy píků byly 375,69; 413,75; 399,98; 339,50 a 404,76 min. Na základě těchto výsledků se MS podmínky ponechaly na původních hodnotách, napětí na kapiláře 2800 V a napětí na vstupu do analyzátoru 40 V.

Jak již bylo uvedeno v kapitole 3.5.2, MS detekce byla využívána k ověření identifikace porothramycinu, proto nebyla zahrnuta do částečné validace metody (viz níže).

#### 4.5 Částečná validace UHPLC metody

Podle validačního protokolu<sup>36</sup> byla provedena částečná validace navržené UHPLC metody, která se skládala ze sestavení kalibrační křivky, určení meze stanovitelnosti (LOQ), kontroly přesnosti a správnosti metody a v neposlední řadě určení výtěžnosti extrakce porothramycinu a ověření jeho stability.



#### 4.5.1 Kalibrační závislost

Ředěním zásobního roztoku, o koncentraci  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ , methanolem byly připraveny roztoky o koncentraci 3,91; 7,81; 15,63; 31,25; 62,50; 125,00; 250,00 a  $500,00 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ , z nichž byla kalibrační závislost sestrojena. Lineární rozsah kalibrační závislosti byl v rozsahu  $3,91\text{--}250,00 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ , při vyšší koncentraci porothramycinu se projevila značná nelinearita.

Rovnice lineární regrese vyhodnocená z ploch píků má tvar:

$$S = 1752,94c + 1116,52 \quad [S] = \text{min}; [c] = \mu\text{g ml}^{-1}$$

Korelační koeficient  $r$  dané rovnice má hodnotu 0,9998 a determinační koeficient  $r^2$  má hodnotu 0,9995.

#### 4.5.2 Mez stanovitelnosti (LOQ)

Mez stanovitelnosti (LOQ; z angl. "Limit of quantification") určité metody je nejnižší koncentrace analytu ve vzorku kalibrační křivky, kterou lze stanovit s přesností do 20 % a správností v rozmezí 80-120 %. Jako LOQ byla označena hodnota koncentrace  $3,91 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  a je ověřena v kapitole (4.5.3) v Tab. 7. Výsledek uvedený výše se vztahuje k možnostem použité instrumentace.

Jestliže se uvažuje prekoncentrace stanovované látky z kultivačního média, pak je hodnota LOQ tolikrát menší, kolikrát byl daný analyt zakoncentrován. V tomto případě byl analyt zakoncentrován 10 $\times$ , z toho plyne, že je mez stanovitelnosti metody LOQM  $0,391 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ .

#### 4.5.3 Přesnost měření

Přesnost metody je definována jako údaj o míře těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek za předem specifikovaných podmínek, neboli míra shody výsledků opakovaného měření homogenního vzorku. Míra přesnosti se vyjadřuje jako směrodatná odchylka získaných výsledků (RSD). Hodnoty s RSD do 15 % se považují za přijatelné. Přesnost metody byla testována na třech koncentračních hladinách: 3,91 (LOQ); 31,25 a  $250,00 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  a každý ze vzorků byl měřen 6 $\times$ . U každé koncentrační

hladiny byla z ploch píků vypočítána RSD v % a výsledky jsou uvedeny v Tab. 9.

Jelikož jsou hodnoty RSD pro všechny tři koncentrační hladiny nižší než 15 %, lze tuto metodu označit za přesnou.

Tab. 9 Vyhodnocení přesnosti metody

| <b>koncentrační hladina/<math>\mu\text{g ml}^{-1}</math></b> | <b>RSD/ %</b> |
|--|---------------|
| 3,91   | 1,29          |
| 31,25  | 0,38          |
| 250,00   | 1,76          |

#### 4.5.4 Správnost metody

Správnost reprezentuje míru shody mezi výsledky měření a správnou (vztaženou) hodnotou. Pokud statistické testování ukáže, že rozdíl mezi výsledky zkoušení a referenční hodnotou není statisticky významný, daná validovaná metoda může být považována za správnou. Pro vyhodnocení správnosti metody byla prováděna opět na třech koncentračních hladinách: 3,91 (LOQ); 31,25 a 250,00  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , každý vzorek byl měřen 6×. Tab. 9 uvádí číselné hodnoty správnosti metody v % získané na základě ploch píků.

Na základě získaných výsledků lze považovat metodu za správnou. Pro mez stanovitelnosti (3,91  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) je totiž povolené rozmezí správnosti 80-120 %, pro ostatní hodnoty pak 85-115 %.

Tab. 9 Vyhodnocení správnosti metody

| <b>koncentrační hladina/<math>\mu\text{g ml}^{-1}</math></b> | <b>správnost/ %</b> |
|--|---------------------|
| 3,91   | 81,40               |
| 31,25  | 104,50              |
| 250,00   | 99,27               |

#### 4.5.5 Stabilita

Pro určení stability porothramycinu byly vybrány dvě koncentrační hladiny: 3,91 (LOQ) a 250,00  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Vzorky byly hodnoceny z hlediska krátkodobé a dlouhodobé stability. Krátkodobá stabilita informuje o stabilitě vzorku během jednoho popř. dvou až tří dnů při laboratorní teplotě a určuje, jak se vzorkem zacházet během zpracování. Pro krátkodobou stabilitu byly připraveny dvě sady vzorků o koncentraci 3,91 (LOQ) a 250,00  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , jedna sada vzorků byla rozpuštěna v 100% a druhá v 50% methanolu. Vzorky byly měřeny po 0; 2; 4; 6; 8; 12 a 24 hod.

Testováním dlouhodobé stability lze zjistit stálost vzorků uchovávaných při jiné než laboratorní teplotě v delším časovém intervalu. Opět byly připraveny dvě sady koncentračních hladin, jedna sada byla uchovávána při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a druhá při  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Koncentrační hladiny obou sad byly připraveny rozpuštěním v 100% methanolu. Všechny vzorky byly měřeny po 0; 1; 2; 3; 7; 14 a 28 dnech.

Vyhodnocením krátkodobé stability bylo zjištěno, že je porothramycin za výše uvedených podmínek stabilní a nedochází k jeho rozkladu. Při použití 100% methanolu byla získána větší odezva (porovnání ploch píků), zvláště pro koncentraci 250,00  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , než při rozpouštění v 50% methanolu.

Z výsledků dlouhodobé stability bylo zjištěno, že není rozdíl v uchovávání porothramycinu při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ale po delším časovém úseku dochází k mírnému zakonzentrování vzorku, a to zvláště pro koncentraci 3,91  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

#### 4.6 Aplikace vyvinuté UHPLC metody

Vyvinutá UHPLC metoda pro stanovení porothramycinu s využitím UV detekce byla použita k testování produkce porothramycinu dvěma kmeny, *Streptomyces albus* subsp. *albus* ATCC39897 a *Streptomyces albus* J1074. Ke kultivaci byla použita následující kultivační média AVM, BG a ISP I. K ověření identifikace látky byla použita i MS detekce.

U těchto šesti vzorků byla potřeba stanovit koncentraci porothramycinu.

Při použití kmene *Streptomyces albus* subsp. *albus* ATCC39897 odpovídala naměřená UV a MS spektra teoretickým hodnotám porothramycinu. Nejvyšší produkce

porothramycinu bylo dosaženo při kultivaci v AVM médiu, hodnota koncentrace byla 130,45  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Naopak při kultivaci v BG a ISP I médiu tento kmen produkoval porothramycin jen v nepatrném množství, koncentrace porothramycinu v BG médiu činila 0,61  $\mu\text{g ml}^{-1}$  a v ISP I médiu byla rovna 1,50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

Z výsledných chromatogramů analýzy porothramycinu u kmene *Streptomyces albus* J1074 bylo zjištěno, že v médiích k produkci této látky nedochází. Nepřítomnost porothramycinu potvrdila i MS detekce. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 10.

Tab. 10 Produkce porothramycinu ve vzorcích

| kultivač. médium | koncentrace porothramycinu / $\mu\text{g ml}^{-1}$ |                                 |
|------------------|--|---------------------------------|
|                  | <i>S. albus</i> subsp. <i>albus</i> ATCC39897      | <i>Streptomyces albus</i> J1074 |
| AVM              | 130,45   | < LOQ                           |
| BG               | 0,61   | < LOQ                           |
| ISP I            | 1,50   | < LOQ                           |

## 5 ZÁVĚR

Prvním a zásadním cílem této práce byla příprava standardu porothramycinu izolací z kultivačního média, který není komerčně dostupný. Jako kultivační médium bylo použito AVM médium, ze kterého byla potřeba porothramycin extrahovat. K tomuto účelu byla využita LLE a následná preparace frakcí hledané látky na HPLC. Pro optimalizaci a částečnou validaci metody stanovení porothramycinu UHPLC metodou se podařilo izolovat 1,7 mg standardu porothramycinu.

Pro rutinní metodu extrakce byla vyvinuta SPE pomocí kolonek Oasis HLB 60 mg. Bylo zjištěno, že LLE extrakce je méně výtěžná než vyvinutá SPE, ale pomocí LLE bylo možné pozorovat větší čistotu extraktu.

Extrakty byly poté podrobeny analýze pomocí metody UHPLC-UV-MS. Tato metoda pro stanovení porothramycinu byla nejprve vyvinuta a optimalizována. Kromě UV detekce byla využita i MS detekce k ověření identifikace hledané látky. Na základě MS detekce byly kromě porothramycinu nalezeny další dva analogy porothramycinu. Jedná se o analog, který nese o jednu methylovou skupinu méně než porothramycin, např. 9-demethoxy-9-hydroxyporothramycin (dmPOR) a analog nesoucí místo N,N-dimethylamidové skupiny skupinu aldehydovou (daPOR). Dále byly pozorovány jednotlivé formy porothramycinu, hemiaminal, aldehyd a pokud byl při testování mobilních fází použit methanol, byla pozorovatelná i methoxy forma porothramycinu.

Vyvinutá a optimalizovaná metoda UHPLC pro stanovení porothramycinu byla následně částečně validována. Na základě výsledků bylo možné tuto metodu označit za přesnou a správnou.

Touto metodou byla poté testovaná produkce porothramycinu v šesti vzorcích. Při testování rozdílné produkce porothramycinu kmeny *S. albus* subsp. *albus* ATCC39897 a *S. albus* J1074 v médiu ISP I, BG a AVM bylo zjištěno, že *S. albus* J1074 porothramycin neprodukuje. Oproti tomu koncentrace porothramycinu produkovaného kmen *S. albus* subsp. *albus* ATCC39897 v AVM médiu činila  $130,45 \mu\text{g ml}^{-1}$  a v BG médiu odpovídala koncentrace porothramycinu hodnotě  $0,61 \mu\text{g ml}^{-1}$  a v ISP I médiu  $1,50 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

Všechny cíle diplomové práce vytyčené v úvodu byly splněny.

## 6 LITERATURA

<sup>1</sup>Marinelli F.: Antibiotics and *Streptomyces*: the future of antibiotic discovery, *Microbiology today*, **36** (1), 20-23 (2009).

<sup>2</sup>Hampl F., Paleček J.; *Farmakochemie*, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha (2002).

<sup>3</sup>Aminov R. I., Mackie R. I.: Evolution and ecology of antibiotic resistance genes, *FEMS Mikrobiology Letters*, **271** (2), 147-161 (2007).

<sup>4</sup>Berdy J.: Bioactive microbial metabolites - A personal view, *Journal of Antibiotics*, **58** (1), 1-26 (2005).

<sup>5</sup>Okawa T., Eguchi S.: Synthesis of pyrazino[2,3-e][1,4]diazepin-5-one and pyrazino[2,3-e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5-one derivatives *via* the intramolecular aza-Wittig reaction, *Tetrahedron* **54**, (22), 5853-5868 (1998).

<sup>6</sup>Tsunakawa M., Kamei H., Konishi M., Miyaki T., Oki T., Kawaguchi H.: Porothramycin, a new antibiotic of the anthramycin group: Production, isolation, structure and biological activity, *Journal of Antibiotics*, **41** (10), 1366–1373 (1988).

<sup>7</sup>Gerratana B.: Biosynthesis, synthesis, and biological activities of pyrrolobenzodiazepines, *Medicinal Research Reviews*, **32** (2), 254-293 (2012).

<sup>8</sup>Leimgruber W., Batcho A. D., Schenker F.: The structure of anthramycin, *Journal of The American Chemical Society*, **87** (24), 5793–5795 (1965).

<sup>9</sup>Tozuka Z., Takaya T.: Studies on tomaymycin 1: The structure determination of tomaymycin on the basis of NMR-spectra, *Journal of Antibiotics*, **36** (2), 142-146 (1983).

- <sup>10</sup>Hurley L. H., Gairola C., Das N. V.: Pyrrolo[1,4]benzodiazepine antibiotics- Biosynthesis of the antitumor antibiotic 11-demethyltomaymycin and its biologically inactive metabolite oxotomaymycin by *Streptomyces achromogenes*, *Biochemistry*, **15** (17), 3760–3769 (1976).
- <sup>11</sup>Šulc M., Fadrhonicová I., Jelínková M., Chudomelová M., Felsberg J., Olšovská J., Determination of sibiromycin and its natural derivatives using new analytical and structural approaches, *Journal of Chromatography A*, **1218** (1), 83–91 (2011).
- <sup>12</sup>Itoh J., Watabe H., Ishii S., Gomi S., Nagasawa M., Yamamoto H., Shomura T., Sezaki M., Kondo S.: Sibanomicin, a new pyrrolo[1,4]benzodiazepine antitumor antibiotic produced by a *Micromonospora* sp., *Journal of Antibiotics*, **41** (9), 1281–1284 (1988).
- <sup>13</sup>Konishi M., Hatori M., Tomita K., Sugawara M., Ikeda C., Nishiyama Y., Imanishi H., Miyaki T., Kawaguchi H.: Chicamycin, a new antitumor antibiotic. 1. Production, isolation and properties, *Journal of Antibiotics*, **37** (3), 191–199 (1984).
- <sup>14</sup>Kunimoto S., Masuda T., Kanbayashi N., Hamada M., Naganawa H., Miyamoto M., Takeuchi T., Umezawa H.: Mazethramycin, a new member of anthramycin group antibiotik, *Journal of Antibiotics*, **33** (6), 665–667 (1980).
- <sup>15</sup>Shimizu K., Kawamoto I., Tomita F., Morimoto M., Fujimoto K.: Prothracarcin, a novel antitumor antibiotik, *Journal of Antibiotics*, **35** (8), 972–978 (1982).
- <sup>16</sup>Hochlowski J. E., Andres W. W., Theriault R. J., Jackson M., McAlpine J. B.: Abbeymycin, a new anthramycin-type antibiotic produced by a streptomycete, *Journal of Antibiotics*, **40** (2), 145–148 (1987).

- <sup>17</sup>Hu W. P., Yu H. S., Chen Y. C., Wang J. J.: Biological evaluation of an antibiotic DC-81-indole conjugate agent in human melanoma cell lines, *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, **19** (1), 6–12 (2003).
- <sup>18</sup>Osada H., Uramoto M., Uzawa J., Kajikawa K., Isono K.: New pyrrolobenzodiazepine antibiotics, RK-1441A and B. 2. Isolation and structure, *Agricultural and Biological Chemistry*, **54** (11), 2883–2887 (1990).
- <sup>19</sup>Takeuchi T., Miyamoto T., Ishizuka M., Naganawa H., Kondo S.: Neothramycin-A and neothramycin-B, new antitumor antibiotics, *Journal of Antibiotics*, **29** (1), 93–96 (1976).
- <sup>20</sup>Fotso S., Zabriskie T. M., Proteau P. J., Flatt P. M., Santosa D. A., Mahmud T.: Limazepines A-F, pyrrolo[1,4]benzodiazepine antibiotics from an Indonesian *Micrococcus* sp., *Journal of Natural Products*, **72** (4), 690–695 (2009).
- <sup>21</sup>Brock T. D., Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J.: *Biology of Microorganisms*, 7th ed., Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey (1994).
- <sup>22</sup>Hurley, L. H.: Pyrrolo(1,4)benzodiazepine antitumor antibiotic - comparative aspects of anthramycin, tomaymycin and sibiromycin, *The Journal of Antibiotics*, **30** (5), 349–370 (1977).
- <sup>23</sup>Hu Y., Phelan V., Ntai I., Farnet Ch. M., Zazopoulos E., Bachmann B. O.: Benzodiazepine Biosynthesis in *Streptomyces refuineus*, *Chemistry & Biology*, **14** (6), 691–701 (2007).
- <sup>24</sup>Wells M. J. M.: In *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*; Mitra, S., John Wiley & Sons, New Jersey, **162**, 37–138 (2003).



- <sup>25</sup>Fifield F. W., Kealey D.: *Principles and Practice of Analytical Chemistry*, 5th ed.; Blackwell Science Ltd.: Oxford (2000).
- <sup>26</sup>Kellner R., et al.: *Analytical Chemistry: A Modern Approach to Analytical Science*, 2nd ed., John Wiley & Sons (2004).
- <sup>27</sup><http://www.zdn.cz/> [cit. 10.7.2009].
- <sup>28</sup>[http://www.younglin.com/brochure\\_pdf/waters/Loasis.pdf](http://www.younglin.com/brochure_pdf/waters/Loasis.pdf) [cit. 10.3.2012]
- <sup>29</sup>McDonald P. D.: [http://www.waters.nl/SPE\\_CHEM.htm#mcx](http://www.waters.nl/SPE_CHEM.htm#mcx) (Waters, 1995), 2012.
- <sup>30</sup>Wren S.A.C., Tchelitcheff P.: Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development, *Journal of Chromatography A*, **1119** (1-2), 140-146 (2006).
- <sup>31</sup>Nguyen D. T. T., Guillarme D., Rudaz S., Veuthey J. L.: Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure, *Journal of Separation Science*, **29** (12), 1836-1848 (2006).
- <sup>32</sup><http://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/Luna/C8?returnURL=/Products/Search/HPLC> [cit. 10.11.2011].
- <sup>33</sup>[http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998\\_04\\_278-286.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998_04_278-286.pdf) [cit. 29.1.2012].
- <sup>34</sup>Holčápek M., Jandera P.: Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS), *Chemické listy*, **92** (4), 278-286 (1998).
- <sup>35</sup><http://www.reaxys.com> [cit. 9.10.2011].
- <sup>36</sup>CDER/CBER, *Guidance for industry: Bioanalytical Method Validation*, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Biologics Evaluation and Research (2001).